

# Entwicklung neuer Methoden zur Analytik von nicht-codierender RNA

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

Spezialisierung: Organische und Bioorganische Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc. Marcel Boss geb. Geufke

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Christoph Arenz
2. Prof. Dr. Dorothea Fiedler
3. Prof. Dr. Sabine Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2020



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Kurzfassung.....	iii
Abkürzungsverzeichnis .....	iv
1. Einleitung .....	6
2. Stand der Forschung.....	8
2.1. Biogenese zirkulärer RNA.....	8
2.2. zirkuläre RNA: Funktion und Krankheiten.....	10
2.3. Experimentelle Methoden zur Detektion zirkulärer RNA.....	13
2.4. Chemo-enzymatische Modifizierung von RNA.....	18
3. Zielstellung .....	24
4. Ergebnisse und Diskussion.....	26
4.1. Interne Modifizierung von zirkulärer RNA .....	26
4.1.1.    Zyklisierung von natürlicher unmodifizierter RNA.....	27
4.1.2.    Enzymatische Herstellung modifizierter zirkulärer RNA über T4 RNA Ligase 1 & 2.....	32
4.1.3.    RtcB Ligase-vermittelte Zyklisierung von modifizierter RNA.....	36
4.1.4.    Chemische Zyklisierung von modifizierter RNA über CuAAC.....	37
4.1.5.    Zusammenfassung der Modifizierung und Zyklisierung von RNA.....	48
4.2. Entwicklung einer <i>rolling circle</i> -basierten Methode zum Nachweis von zirkulärer RNA.....	50
4.2.1. <i>Rolling circle</i> -RT-PCR-Methode der ersten Generation zur Unterscheidung von linearer und zirkulärer RNA.....	51
4.1.2. <i>Rolling circle</i> -RT-PCR-Methode der zweiten Generation zum spezifischen Nachweis von zirkulärer RNA .....	56
4.2.3.    Anwendung der <i>rolling circle</i> -RT-PCR-Methode der zweiten Generation bei biologischen Proben.....	61
4.2.4.    Zusammenfassung der Etablierung einer <i>rolling circle</i> -basierten Methode zum spezifischen Nachweis von zirkulärer RNA .....	63
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	65
6. Experimenteller Teil .....	68
6.1    Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	68
6.2    Lösungen und Puffer .....	68
6.3    Enzyme, Kits und DNA/RNA-Marker .....	69
6.4    Template, Oligonukleotide, RNA-Bausteine.....	71
6.5    Messgeräte.....	76
6.6    Molekularbiologische Methoden .....	76

7. Literaturverzeichnis .....	84
8. Anhang.....	91
Danksagung.....	95
Publikationen & Konferenzteilnahmen .....	97
Erklärung zur Veröffentlichung in der Hochschul-schriftenstelle gemäß § 15 Abs. 5 .....	98
Selbstständigkeitserklärung.....	99
Summary .....	100

# Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Methoden zur Untersuchung zirkulärer RNA. Das erste Projekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Erstellung eines universell einsetzbaren Protokolls zur Generierung einer funktionalisierten zirkulären RNA. Hierbei konnte zunächst erfolgreich eine Vorschrift zur Herstellung unmodifizierter circRNA etabliert werden. Im zweiten Schritt gelang auch die Generierung einer zirkulären RNA mit Alkin-Funktionalisierung. Geringe Ausbeuten gaben Anlass zur Entwicklung eines alternativen Verfahrens, bei dem die Zyklisierung von Kopf-Schwanz modifizierter RNA durch CuAAC vorgenommen werden sollte. Dabei konnte zunächst eine 5'-azidmodifizierte RNA durch *in vitro* Transkription gebildet werden, die anschließend am 3'-Terminus mit einem 3'-alkinmodifizierten Baustein mit Aminfunktionalität versehen wurde. Daraufhin konnte erfolgreich eine Zyklisierung mittels CuAAC vorgenommen werden. Ein grundlegendes Problem bei diesen Arbeiten war der Nachweis, dass die gebildete RNA tatsächlich in zirkulärer Form vorlag.

Im Rahmen des zweiten Projektes dieser Arbeit wurde ein Assay zur direkten Unterscheidung von zirkulären und linearen Transkripten etabliert. Mittels reverser Transkription konnte ein *rolling circle* Mechanismus mit dem zirkulären Transkript durchgeführt werden, was in einer multimeren cDNA resultierte. Nach Amplifizierung über qPCR ermöglichte eine Gelanalyse den Nachweis eines spezifischen Bandenmusters für das circRNA-Transkript, wohingegen das lineare Transkript lediglich eine monomere Bande generierte. Anschließend erfolgte die Weiterentwicklung des Assays zu einer spezifischen Nachweismethode für zirkuläre RNA in biologischen Proben. Dabei kann eine abschließende Gelanalyse zur Identifizierung von falsch-positiven Ergebnissen genutzt werden. Die hier etablierte Methode ermöglicht künftig einen schnellen und einfachen Nachweis von circRNA beim Screening von biologischen Proben.

# Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzung von Nukleotiden erfolgte mittels Einbuchstabencode. Die Positionen von Modifizierungen an Nukleotidbausteinen wurde mit 5' oder 3'-Angaben kenntlich gemacht.

$\lambda$	Wellenlänge [nm]	ds	doppelsträngig
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge [nm]	DTT	1,4-Dithiothreitol
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge [nm]	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Abb.	Abbildung	EIcRNA	<i>exonic intronic circular</i> RNA
Ac	Acetyl	<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
AMP	Adenosinmonophosphat	FAM	5,6-Carboxyfluorescein
AMTC	1-( <i>trans</i> -2-hydroxycyclohexyl)- 4-( <i>N,N</i> -dimethylaminomethyl)- 1,2,3-triazole	G <sub>exo</sub>	exogenes Guanosin
APS	Ammoniumpersulfat	GTP	Guanosintriphosphat
Äq	Äquivalente	h	Stunde(n)
ATP	Adenosintriphosphat	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazi- nyl)ethansulfonsäure
Bp	Basenpaar(e)	IEDDA	Diels-Alder-Reaktion mit inversen Elektronenbedarf
bp	<i>branch point</i>	lncRNA	<i>lon non-coding</i> RNA
BHQ-1	<i>Black Hole Quencher 1</i>	M	Molarität
cDNA	<i>complementary</i> DNA	min	Minuten
ceRNA	kompetitive endogene RNA	miRNA	mikroRNA
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>	MRE	miRNA-erkennendes Element
circRNA	zurkuläre RNA	mRNA	<i>messenger</i> -RNA
ciRNA	<i>circular intronic</i> RNA	nt	Nukleotid(e)
cT	<i>threshold cycle</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Cu <sup>I</sup>	Kupfer(I)	PCI	Phenol/Isoamylalkohol/Chloro- form
CuAAC	Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition	PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i>
CTP	Cytidintriphosphat	PNK	Polynukleotidkinase
denat.	denaturiert	PrPc	Prionprotein(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid	qPCR	quantitative PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RC	<i>rolling circle</i>
DNase	Desoxyribonuklease	RCA	<i>rolling circle amplification</i>
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-tri- phosphat	RNA	Ribonukleinsäure
		RNase	Ribonuklease

rNTP	Ribonukleosid-5'-Triphosphat		diamin
rRNA	ribosomale RNA	THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazol-
RT	reverse Transkription		methyl)amine
siRNA	<i>short-interfering</i> RNA	TOM	2'-O-[(Trisopropylsilyl)oxy]-
snRNP	<i>small nuclear ribonucleo-</i> <i>protein</i>		methyl
ss	einzelsträngig	Tris	Tris(hydroxymethyl)amino-
TBE	Tris/Borat/EDTA		methan
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-	U	Unit(s)
	4-yl)methyl]amin	UTP	Uridintriphosphat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylen-	UV	Ultraviolett
		Vis	<i>visible</i>

# 1. Einleitung

„Das, was aus Bestandteilen so zusammengesetzt ist, dass es ein einheitliches Ganzes bildet, (...) das ist offenbar mehr als bloß die Summe seiner Bestandteile.“  
(Aristoteles, Metaphysik VII 17, 1041b)

Diese Worte analysierten und interpretierten Menschen schon seit über 2000 Jahren und auch heute können sie noch auf aktuelle Themen, wie das humane Genomprojekt, Anwendung finden. In diesem Projekt arbeiteten zu Beginn 1000 Forscher aus 40 Ländern an der Entschlüsselung des menschlichen Genoms, was im Jahr 2003 offiziell abgeschlossen wurde. Die Forscher gingen davon aus, dass zwischen der Genanzahl eines Organismus und seiner Komplexität ein kausaler Zusammenhang besteht [Claverie *et al.* 2001]. Nach Abschluss des Projektes war jedoch die Frage zu klären, warum die Anzahl der menschlichen Gene nahezu identisch mit der des Fadenwurms *C. elegans* ist? Die Antwort auf diese Frage war so simpel, wie sie in der weiteren Erforschung komplex ist. Es musste nicht die Menge der Gene, sondern deren Regulation der Schlüssel sein, der den Unterschied zwischen Mensch und Fadenwurm ausmacht.

Da der Mensch aus 200 verschiedene Zellarten besteht, die alle die gleiche Erbinformation aufweisen, stellte sich die Frage nach dem Regulationsmechanismus, der entscheidet, wann ein Gen aktiviert, in messenger RNA (mRNA) umgeschrieben und in ein Protein translatiert wird. Lange war bekannt, dass Acetylierungen von Histonen oder DNA-Methylierungen das Ablesen der DNA-beeinflussen. Transkriptionsfaktoren, die an Promotorregionen von Genen binden, können ebenfalls die Transkription unterdrücken oder einleiten. Aber erst mit der Entdeckung der mikroRNAs (miRNA) erschien ein Regulationsmechanismus entdeckt, der die Komplexität aufwies, um die umfangreiche Genregulation zu erklären. Diese miRNA gehören zur Gruppe der *non-coding* RNAs und sind kurze Sequenzen, die eine Feinregulation der Gene ermöglichen [Lee RC *et al.* 1993, Reinhart *et al.* 2000]. Jedoch zeigte sich im Jahr 2013 mit der Beschreibung der zirkulären RNA (circRNA) CDR1as (oder ciRS-7), dass die Genregulation durch miRNAs weit umfangreicher ist, als bis dahin angenommen. Es konnte gezeigt werden, dass CDR1as die miRNA miR7 binden kann und als Speicherplattform Einfluss auf die miR7- Aktivität nimmt [Hansen, Jensen *et al.* 2013]. Damit wurde nachgewiesen, dass ein miRNA-Regulator selbst durch eine circRNA reguliert wird. Nach dieser Beschreibung entwickelte sich das Feld der



## Einleitung

zirkulären RNAs von einer Rarität zu einer Schlüsselrolle in der Genregulation und es folgte in den kommenden Jahren die Identifizierung von tausenden circRNAs in unterschiedlichen Organismen [Memczak *et al.* 2013; Legnini *et al.* 2017]. So schnell jedoch die Identifizierung der circRNAs erfolgte, schreitet deren vollständige Charakterisierung nur langsam voran. Die Ursache hierfür liegt in dem Vorhandensein von wenigen geeigneten Methoden zur experimentellen Untersuchung von circRNAs. Da sich eine zirkuläre RNA ausschließlich durch die Verknüpfung der Termini von ihrem linearen Gegenstück unterscheidet, wird die Zuordnung spezifischer Eigenschaften für eine der beiden Isoformen erschwert. Daher ist in erster Linie die Entwicklung einer geeigneten Methode zur spezifischen Untersuchung von zirkulären RNAs notwendig, was eine anschließende Charakterisierung der circRNAs ermöglicht. Aufgrund der Vielzahl an natürlichen circRNAs wird diese Aufgabe weltweit Forschungsgruppen für einen langen Zeitraum beschäftigen, letztlich jedoch zum Verständnis der nicht-codierenden RNAs beitragen und so das Wissen um die zellulären Mechanismen erweitern.

## 2. Stand der Forschung

### 2.1. Biogenese zirkulärer RNA

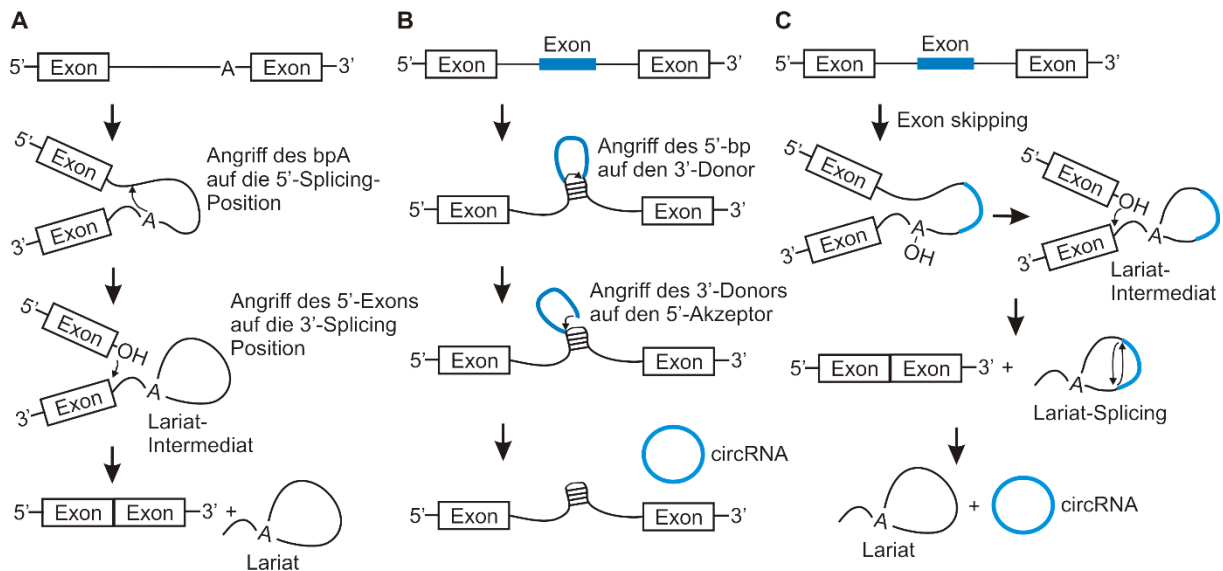
Zirkuläre RNA wurden bis vor einigen Jahren nur als Nebenprodukte angesehen, die bei Fehlern im Spleißprozess auftreten [Cocquerelle *et al.* 1993]. Tatsächlich verläuft die Bildung von circRNAs zielgerichtet und zeigt bei einigen Vertretern eine mehr als zehnfach höhere Expression als das lineare Transkript desselben Gens [Jeck *et al.* 2013]. *In vivo* können circRNAs sowohl aus Exons, als auch aus Introns generiert werden.

In eukaryotischen Zellen werden Introns durch das Spliceosom in einem 2-Schritt-Mechanismus aus den Transkripten entfernt [Petkovic, Müller 2015]. Der erste Schritt stellt einen Angriff einer 2'-OH-Gruppe eines im Intron enthaltenen definierten Adenosins (*branch point* Adenosin) auf die 5'-Spleißposition dar. Dies führt zur Bildung eines freien 5'-Exons mit 3'-OH-Gruppe und eines Lariat-Intermediates. Im zweiten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der 3'-Hydroxylgruppe des freien Exons auf die 3'-Spleißposition, was zur Generierung einer intronischen Lariat-RNA und einer linearen RNA, bestehend aus den beiden Exons, führt (Abb. 2-1A).

Wie erstmals 1991 beschrieben, kann es durch das Spliceosom auch zur Bildung von zirkulären Exons kommen [Nigro *et al.* 1991]. Seitdem wurden tausende körpereigene circRNAs in Säugetierzellen identifiziert, darunter waren sowohl stark exprimierte, als auch evolutionär konservierte circRNAs [Jeck *et al.* 2014; Hentze, Preiss 2013; Lasda, Parker 2014]. Zum aktuellen Zeitpunkt werden zwei Mechanismen zur Generierung von exonischen circRNAs diskutiert. Zum einen das direkte *backsplicing* und zum anderen das Exon *skipping*.

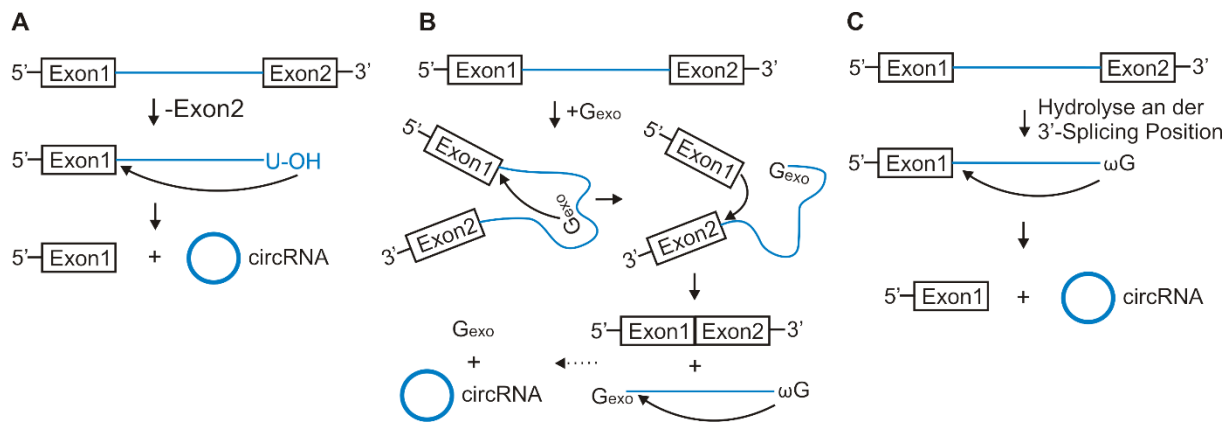
Der Mechanismus des direkten *backsplicing* beruht auf der Verknüpfung des 5'- und 3'-Endes eines Exons [Cocquerelle *et al.* 1993]. Dabei wird das Exon zirkularisiert, aus dem Transkript extrahiert und die beiden benachbarten Introns verknüpft (Abb. 2-1B). Der zweite Mechanismus folgt dem normalen Mechanismus des Spleißens (Abb. 2-1A), jedoch mit dem Unterschied des Exon *skippings*. Dabei wird ein Exon übersprungen, und es kommt zur Bildung einer Lariat-RNA mit enthaltenem Exon. Dies ermöglicht den Ablauf des Lariat-Spleißens, wodurch das Exon zyklisiert und aus dem Lariat entfernt wird [Zaphiropoulos 1996; Zaphiropoulos 1997] (Abb. 2-1C). *In vivo* sind beide Mechanismen plausibel, jedoch wird das direkte *backsplicing* als Mechanismus favorisiert [Jeck, Sharpless 2014]. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere Mechanismen an der circRNA-Bildung beteiligt sind. Untersuchungen zeigten, dass flankierende Intronsequenzen die Generierung von circRNAs

beeinflussen können. So bestimmen RNA-RNA-Interaktionen der Introns, einhergehend mit Basenpaarungen die Effizienz der Exon-Zyklisierung [Zhang *et al.* 2014; Liang, Wilusz 2014; Ivanov *et al.* 2015; Starke *et al.* 2015; Wang Y, Wang Z 2014]. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen Zyklisierung und linearem Spleißen mit einer funktionalen Rolle in der Genregulation nachgewiesen werden [Ashwal-Fluss *et al.* 2014; Jeck, Sharpless 2014].



**Abb. 2-1 | Darstellung des regulären linearen Spleißens (A) und zwei Modellen zur Bildung von exonischer circRNA (B,C).** (A) Angriff des *branch point* Adenosins (bpA) auf die 5'-Spleißposition zur Bildung eines intronischen Lariat-Intermediates und des 5'-Exons mit freier 3'-Hydroxylgruppe. Ein nukleophiler Angriff des freien 5'-Exons auf die 3'-Spleißposition führt zur Verknüpfung beider Exons und einem freien Intron-Lariat. (B) Das direkte *backsplicing*. Zwei Introns basenpaaren miteinander und ermöglichen einen nukleophilen Angriff des *branch points* des 5'-Introns auf die 3'-Intron-Exon-Verknüpfung (3'-Splicingdonor). Der 3'-Splicingdonor greift die 5'-Intron-Exon-Schnittstelle an, zur Verknüpfung beider Introns und Generierung einer exonischen circRNA. (C) Das *Exon skipping*. Bildung eines Lariat-Intermediates mit darin enthaltenem Exon durch *Exon skipping* nach dem normalen Mechanismus des Spleißens. Nach Spleißen innerhalb des Lariats, kommt es zur Bildung eines Intron-Lariats und einer exonischen circRNA.

Neben der Zyklisierung von Exons ist auch die Generierung von zirkulären Introns möglich. So kann über den normalen Spleißmechanismus des Spleiceosoms auch ein Intron-Lariat gebildet werden (Abb. 2-1A). Darüber hinaus ist bekannt, dass Gruppe II-Introns auch circRNAs über die Ausbildung von 2',5'-Phosphodiesterbindungen generieren können [Pi-Pook-Than, Bonen 2006; Molina-Sanchez *et al.* 2006]. Eine Zyklisierung erfordert den Verlust des 3'-Exons, beispielsweise durch trans-Spleißen. Im Folgenden kann die terminale 2'-Hydroxylgruppe des Introns die 5'-Intron-Exons-Verknüpfung angreifen, was zur Entstehung des zirkulären Introns und des freien 5'-Exons führt (Abb. 2-2A).



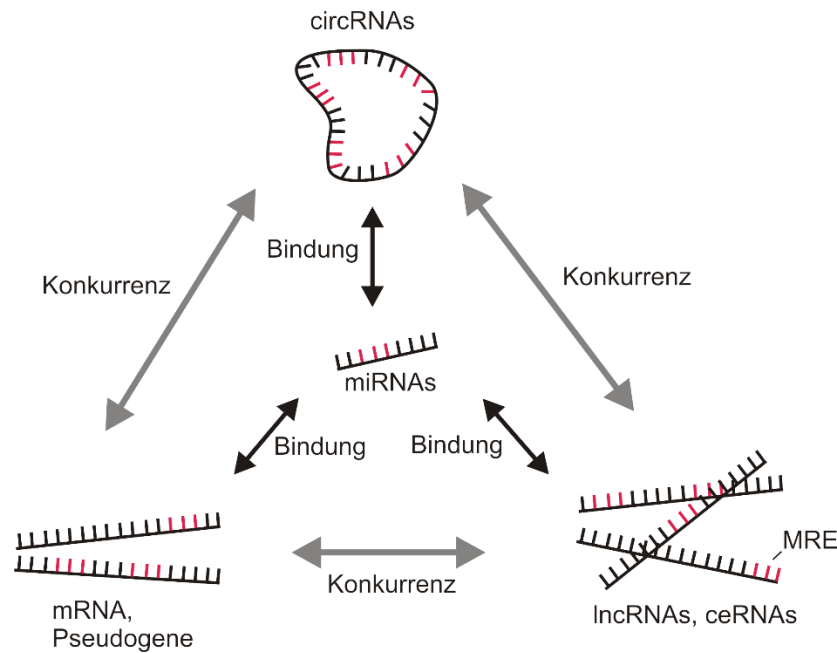
**Abb. 2-2 | Modelle zur Bildung von intronischer circRNA. (A)** CircRNA-Bildung durch Gruppe II-Introns. Nach Verlust des 3'-Exons kommt es zum Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des Introns auf die 5'-Splice-Position mit Generierung einer circRNA über Ausbildung einer 2',5'-Phosphodiesterbindung. **(B)** Reguläres Spleißen der Gruppe I-Introns. Ein exogenes Guanosin ( $G_{exo}$ ) lagert sich in die Intronstruktur ein und greift die 5'-Splice-Position an. Bei der ersten Umesterung wird das 5'-Exon abgespalten und das  $G_{exo}$  mit dem Intron verknüpft. Die 3'-OH-Gruppe des freien 5'-Exons attackiert die 3'-Splice-Position, was die Verknüpfung beider Exons und die Bildung eines linearen Introns zur Folge hat. In diesem Fall ist eine abschließende Zyklisierung über Ausbildung einer 2',5'-Phosphodiesterbindung möglich. **(C)** Eine Hydrolyse des Exon 2 ermöglicht die direkte Zyklisierung über nucleophilen Angriff des  $\omega G$  auf die 5'-Splice-Position.

Neben Gruppe II-Introns sind auch Gruppe I-Introns zur Zyklisierung befähigt. So kann mittels eines exogenen Guanosins ( $G_{exo}$ ) das 5'-Exon durch das  $G_{exo}$  ersetzt werden. Nach einer Umesterung werden die beiden Exons verknüpft und eine lineare katalytische RNA gebildet [Cech 1990]. Abschließend kann das 3'- $G_{exo}$  die 5'-Position der linearen RNA nukleophil angreifen und eine zirkuläre intronische RNA generieren [Grabowski *et al.* 1981] (Abb. 2-2B). Die Länge der hierbei gebildeten circRNAs variiert jedoch aufgrund unterschiedlicher Phosphate die angegriffen werden. So entstehen mehrere gekürzte zirkuläre Produkte die sich durch eine kürzere Lebenszeit auszeichnen [Brehm, Cech 1983]. Die Zyklisierung von ganzen Introns ist ebenfalls möglich. Dies wird durch eine hydrolytische Spaltung der 3'-Splice-Position mit anschließenden nukleophilen Angriff des 3'- $\omega G$  auf die 5'-Splice-Position realisiert [Inoue *et al.* 1986]. Final wird so eine zirkuläre intronische RNA mit voller Länge, sowie zwei nicht ligierte Exons, gebildet (Abb. 2-2C).

## 2.2. zirkuläre RNA: Funktion und Krankheiten

Zirkuläre RNAs werden in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstufen von Organismen unterschiedlich stark exprimiert [Salzman *et al.* 2013; Memczak *et al.* 2013]. Daher wurden circRNAs schnell genregulatorische Funktionen zugeschrieben, die später auch bestätigt

wurden. So stellen einige circRNAs, miRNA-sponges oder potenzielle kompetitive endogene RNAs (ceRNAs) dar [Hansen, Jensen *et al.* 2013; Li, Zhang *et al.* 2015; Taulli *et al.* 2013]. Die ceRNAs enthalten miRNA erkennende Elemente (miRNA recognition elements, MRE), wie sie in mRNAs, Pseudogenen und *long noncoding* RNAs vorkommen [Shi *et al.* 2013] (Abb. 2-3). Somit sind einige circRNAs, ebenso wie auch mRNAs, Pseudogene, lncRNAs und ceRNAs zur Bindung von miRNA fähig [Suzuki, Tsukahara 2014]. Damit gehören sie in das Netzwerk der RNAs, welche die Zellhomöostase regulieren [Qu *et al.* 2015].



**Abb. 2-3 | Netzwerk regulierender RNAs nach Qu *et al.*.** Die ceRNAs, circRNAs, mRNAs, Pseudogene und lncRNAs enthalten miRNA-erkennende Elemente (MRE) und binden kompetitiv miRNAs. Sie erhalten das dynamische Gleichgewicht zur Regulation der Zellhomöostase [Qu *et al.* 2015].

Zwei Beispiele hierfür sind die exonischen circRNAs ciRS-7/CDR1as und *Sry*. Beide circRNAs binden miRNAs ohne dadurch selbst abgebaut zu werden und hemmen dadurch die Aktivität der gebundenen miRNAs [Jeck, Sharpless 2014]. Das ciRS-7/CDR1as besitzt 70 Bindestellen für die miRNA miR-7, wird aber aufgrund einer nur teilweisen komplementären Anbindung nicht abgebaut [Hansen, Jensen *et al.* 2013]. Daher fungiert CDR1as als Speicherplattform für die miR-7. Aber auch die nahezu vollständig komplementäre Bindung der miRNA miR-671 ist möglich, was die Spaltung des CDR1as initiiert [Hansen *et al.* 2011]. Auch die circRNA *Sry*, welche aus dem Transkript der geschlechterbestimmenden Region Y in Mäusen gebildet wird, weist 16 Bindestellen für die miRNA miR-138 auf und stellt somit ebenfalls einen miRNA-sponge dar [Capel *et al.* 1993; Hansen, Jensen *et al.* 2013].

Eine weitere Funktion zirkulärer RNAs besteht in der Regulation von alternativen Schleißen

oder Transkriptionen. Ashwal-Fluss *et al.* beschrieb die circRNA circMbl, welche aus dem zweiten Exon für den Splicing-Faktor MBL gebildet wird und mit dem Splicing der pre-mRNA konkurriert [Ashwal-Fluss *et al.* 2014]. Das circMbl enthält mehrere Bindungspositionen für den Splicing-Faktor MBL. Somit führt eine Änderung des MBL-Levels auch zu einer Beeinflussung der circMbl-Bildung. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Splicing-Faktoren, wie MBL, sich selbst regulieren, indem ein dynamisches Gleichgewicht zwischen circRNA-Biogenese und Splicing aufrecht gehalten wird. Zudem konnten mehrere single-exon circRNAs in menschlichen Fibroblasten bestätigt werden, die eine Translationsstartposition enthalten [Jeck, Sharpless 2014]. Dies deutet darauf hin, dass circRNAs an Translationsstartregionen binden können und die Proteintranslation regulieren.

Darüber hinaus wurde aufgedeckt, dass circRNAs die Genexpression regulieren können. So können ciRNAs (*circular intronic RNAs*) aus Lariat-Introns gebildet werden und über die Anbindung an die RNA Polymerase II eine Transkription einleiten [Zhang *et al.* 2013]. Ebenso ist die Anbindung einer EliciRNA (*exon intronic circRNA*) an das U1 snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*) möglich, was wiederum eine Interaktion mit dem RNA-Polymerase II-Transkriptionskomplex ermöglicht und so die Genexpression initiiert [Li, Huang *et al.* 2015]. Auch die Tatsache, dass circRNAs miRNA-Bindestellen aufweisen können und somit als miRNA-Fänger fungieren, zeigt deren Bedeutung in der Genregulation. Denn ein hohes CircRNA-Level kann die Menge an freier miRNA reduzieren und so die Translation von Gentranskripten erhöhen [Li, Zhang *et al.* 2015].

Interessanterweise ist nur eine einzige circRNA bekannt, die in eukaryotischen Zellen translatiert wird. Das Hepatitis-D-Virus (HDV), welches ein subviraler Satellitenvirus des Hepatitis-B-Virus (HBV) ist, kann bei Verkapselung mit HBV in ein einziges virales Protein umgesetzt werden [Abbas, Afzal 2013; Alves *et al.* 2013].

Zirkuläre RNAs weisen umfangreiche Funktionen im Bereich der Genregulation auf, daher ist es naheliegend, dass sie auch an einer Vielzahl an Erkrankungen beteiligt sind. Studien haben gezeigt, dass die Expression der circRNA CDR1as durch die Überexpression von Prion-Proteinen (PrPC) in HEK293-Zellen induziert wird [Saroh, Yamamura 2004]. Dies lässt darauf schließen, dass PrPC an der Regulation von CDR1as beteiligt ist, was wiederum auf eine Rolle des circRNA CDR1as in Prionenkrankheiten hindeutet [Hansen, Kjems *et al.* 2013]. Im Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen der circRNA circMbl und myotonischer Dystrophie, einer Erkrankung der Muskulatur. Das MBL reguliert die pre-mRNA Splicing-Effizienz zwischen der mbl mRNA und dem circMbl. Darüber hinaus kann die circRNA circMbl einen Überschuss an MBL über Anbindung ausgleichen [Ashwal-Fluss *et al.* 2014].

Aufgrund der engen Verknüpfung der MBL-Funktion und der myotonischen Dystrophie, besteht auch die Möglichkeit, dass das circMbl an dem Ausbruch und dem Verlauf dieser Krankheit beteiligt ist.

Es steht fest, dass miRNAs an nahezu allen Bereichen der zellulären Funktionen beteiligt sind [Humphries, Yang 2015] und entscheidende Rollen im Verlauf verschiedenster Krankheiten spielen [Garzon *et al.* 2009; Esquela-Kerscher, Slack 2006]. Aufgrund der Interaktion von circRNAs mit miRNAs besteht die Möglichkeit, dass auch die zirkulären RNAs an diesen Krankheiten involviert sind. Beispielsweise ist bekannt, dass die circRNA CDR1as stark im Gehirn exprimiert wird und über 60 Position zur Bindung der miRNA miR-7 enthält [Memczak *et al.* 2013; Hansen, Jensen *et al.* 2013; Hansen, Wiklund *et al.* 2011; Dropcho *et al.* 1987]. Die miR-7 ist an einer Vielzahl unterschiedlichster Regulationen und Krankheiten verwickelt, wie der Regulation von  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin-Proteinligase A (UBE2A). Das CDR1as selbst ist bekannt dafür an Parkinson, Alzheimer und der Entwicklung des Gehirns beteiligt zu sein [Memczak *et al.* 2013; Hansen, Jensen *et al.* 2013; Hansen, Kjems *et al.* 2013; Lukiw 2013]. Gleichzeitig wurden der miR-7 sowohl tumorfördernde, als auch -unterdrückende Eigenschaften zugeschrieben, was somit auch eine Beteiligung des CDR1as/miR-7-Komplexes an der Krebsentstehung und dessen Verlauf bedeutet [Meza-Sosa *et al.* 2014; Suro *et al.* 2015; Hao *et al.* 2015; Kalinowski *et al.* 2014; Bahn *et al.* 2015].

Diese Beispiele zeigen die vielseitigen regulatorischen Eigenschaften von circRNAs. Jedoch liegt der Schlüssel zu deren biologischen Wirksamkeit in der deutlichen längeren Lebensdauer im Vergleich zu linearen RNAs. Der Grund hierfür liegt im Fehlen freier Termini, welche das Ziel von Ribonukleasen darstellen und den Abbau von RNA vermittelt. Somit können zirkuläre RNAs eine Lebensdauer von über 24 h haben und somit eine biologische Wirkung über einen langen Zeitraum aufrechterhalten [Memczak *et al.* 2019].

### 2.3. Experimentelle Methoden zur Detektion zirkulärer RNA

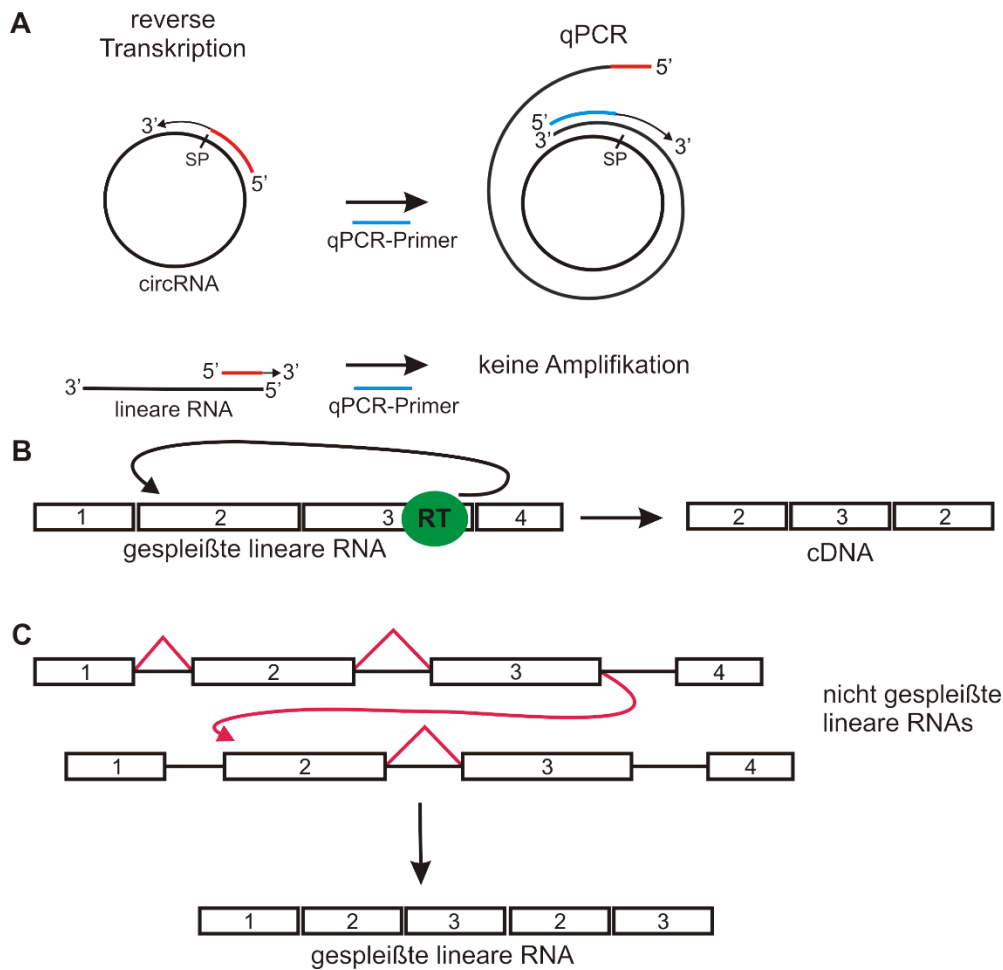
Die Identifizierung neuer natürlicher zirkulärer RNAs verläuft über bioinformatische Analysen von Daten aus RNA-Sequenzierungen. Die dabei verwendeten RNA-Bibliotheken durchlaufen im Vorfeld eine biochemische Differenzierung von linearer und zirkulärer RNA mittels Exonukleasen, wie RNase R, die zirkuläre RNA nicht abbauen können. Nur geringe Mengen linearer RNA treten aufgrund eines unvollständigen Verdaus auf. Die RNA-Sequenzierungsdaten werden anschließend mit bioinformatischen Filtern bearbeitet, um unbekannte Splicing-Produkte zu bestimmen. Die dafür verwendeten Algorithmen werden

spezifisch erstellt, um das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen zu minimieren. Diese spezifischen Suchen führen jedoch dazu, dass die Ergebnisse mehrerer Algorithmen nur selten übereinstimmende Treffer ergeben. Ebenso gibt es keine einheitliche Methode um die Genauigkeit dieser bioinformatischen Filter zu beurteilen [Szabo, Salzman 2016]. Daher ist eine experimentelle Untersuchung der potenziellen circRNAs zwingend notwendig.

Die am meisten genutzte experimentelle Methode zur Bestätigung zirkulärer RNA-Sequenzen in einem RNA-Pool (z.B. Gesamt-RNA) ist eine reverse Transkription mit anschließender quantitativer PCR (RT-qPCR). Dabei werden meist divergente DNA-Primer eingesetzt, die so geschlatet sind, dass nur zirkuläre RNA in voller Länge transkribiert werden. Daher verläuft die reverse Transkription in Richtung der Spleißposition (Abb. 2-4A). Die dabei generierte cDNA wird anschließend mit einem zweiten DNA-Primer in einer qPCR amplifiziert. Der Einsatz divergenten Primern verhindert das Umschreiben der linearen Isoform in eine cDNA. Bei dieser Methode kann es jedoch zu einer Komplikation in der reversen Transkription mit der linearen RNA kommen. Dabei handelt es sich um das *Template switching*, wobei das reverse Transkriptions-Enzym eine weitere Kopie eines *upstream* Exons an die gebildete Sequenz anhängt (Abb. 2-4B). Die dabei entstehende, sich wiederholende, Sequenz ermöglicht in der anschließenden qPCR die Amplifikation einer DNA, die ein falsch-positives Ergebnis darstellt. Ebenso verhält es sich mit dem Phänomen des *Trans-backsplicings*, wobei ein RNA-Molekül mit einem anderen zusammengespleißt wird, was ebenfalls zu einer sich wiederholenden Sequenz führt (Abb. 2-4C). Daher kann bei dieser Methode keine unbehandelte RNA-Bibliothek als Ausgangspunkt genutzt werden. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden müssen lineare Sequenzen in der Bibliothek durch RNase R abgebaut werden. Eine solche RNase R<sup>+</sup>-Bibliothek enthält zum größten Teil zirkuläre Sequenzen. Diese Methode wurde schon im Jahr 2013 bei der Untersuchung der circRNA CDR1as verwendet und hat seitdem mehrere falsch-positive Ergebnisse aus bioinformatischen Analysen aufgedeckt [Jeck *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014; Gao *et al.* 2015; Hansen *et al.* 2015].

Bei der Verwendung von RNase R-behandelten Bibliotheken kann es jedoch zu Strangbrüchen kommen, was dazu führt, dass circRNAs durch die RNase R verdaut werden und somit durch das Suchraster fallen. Ebenso verhält es sich mit circRNAs die über eine verminderte RNase R-Resistenz verfügen. Zudem stellt die Reproduzierbarkeit der in den Bibliotheken auftretenden circRNA-Replikate ein Problem dar. Denn weniger als 50 % der circRNAs, die im ersten Bibliotheksansatz eine RNase R-resistenz aufweisen, zeigen diese auch in einem zweiten Ansatz [Szabo, Salzman 2016].

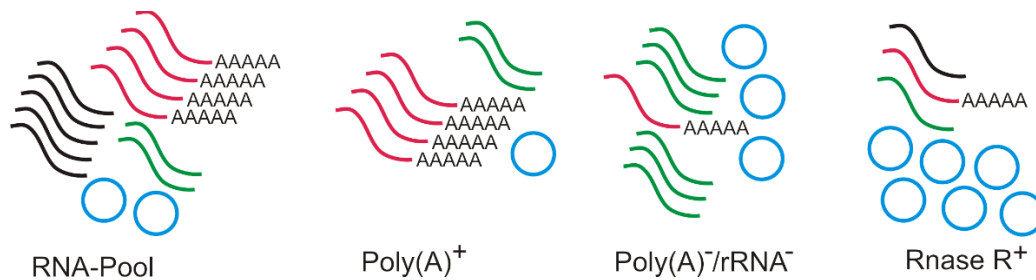




**Abb. 2-4 | Standard-Methode zum experimentellen Nachweis von zirkulären RNAs.** (A) Direkte Gegenüberstellung der Nachweismethode mit zirkulärem und linearem RNA-Template und divergenten DNA-Primern. Der RT-qPCR-Primer (rot) bindet an die circRNA und generiert eine cDNA von 5' nach 3'. Anschließend wird die cDNA mittels eines zusätzlichen qPCR-Primers (blau) amplifiziert. Mit dem linearen RNA-Template kann hingegen keine cDNA generiert werden. (B) Template *switching* durch die reverse Transkriptase (RT), wobei das Enzym eine weitere Kopie des *upstream* Exons an das Transkript anhängt. (C) Trans-*backsplicing*, bei dem ein RNA-Molekül durch den Spleißvorgang mit einem anderen verknüpft wird (roter Kurvenpfeil). Reguläres Spleißen ist durch rote Winkel dargestellt.

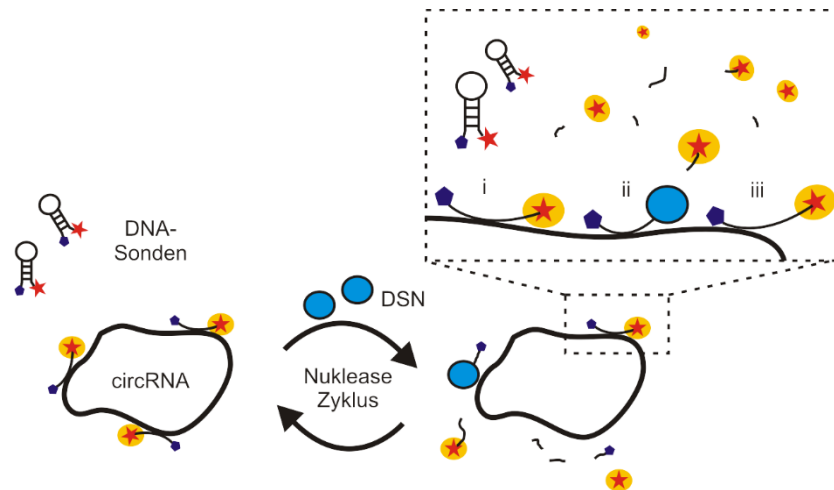
Neben den RNase R-behandelten Bibliotheken, werden auch Poly(A)<sup>+</sup>-Bibliotheken zur Bestätigung von potenziellen circRNAs verwendet. Bei Poly(A)<sup>+</sup>-Bibliotheken handelt es sich um RNA-Pools, die hauptsächlich gereifte posttranskriptional polyadenylierte mRNAs enthalten (Abb. 2-5). Diese werden in der Regel durch magnetische Poly(T)-Beads isoliert und getrennt von ribosomaler, nicht-kodierender und zirkulärer RNA, die sogenannten Poly(A)<sup>-</sup>-Bibliothek. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass zirkuläre RNAs nicht polyadenyliert werden und somit die detektierte circRNA-Menge in der Poly(A)<sup>+</sup>-Bibliothek deutlich niedriger ist als vor der mRNA-Isolation. Einerseits bringt diese Methode den Vorteil, dass kein RNase R-Verdau notwendig ist, aber gleichzeitig können Signale für weniger stark exprimierte

circRNAs im Experiment untergehen, wenn ebenfalls eine mRNA-Variante der zirkulären RNA vorliegt [Szabo *et al.* 2015; Westholm *et al.* 2014; Guo *et al.* 2014]. Des Weiteren besteht die Notwendigkeit einer Abtrennung von ribosomaler RNA in der Poly(A)<sup>-</sup>-Bibliothek durch einen Sucrose-Gradienten, da der starke Überschuss an rRNA eine Detektion der circRNA behindert. Dieser zusätzliche Aufreinigungsschritt bedeutet jedoch weitere Strangbrüche für den circRNA-Pool.



**Abb. 2-5 | Schematische Darstellung gängiger RNA-Bibliotheken für die Detektion zirkulärer RNAs.** Poly(A)<sup>+</sup>-Bibliotheken werden aus RNA-Pools mittels magnetischen Beads isoliert. Dabei entsteht ebenfalls eine Poly(A)<sup>-</sup>-Bibliothek, welche nach Aufreinigung mit einem Sucrose-Gradienten auch keine rRNA aufweist. Nach Behandlung eines RNA-Pools mit RNase R, entsteht eine RNase R<sup>+</sup>-Bibliothek, welche hauptsächlich zirkuläre RNAs enthält. Ribosomale RNA ist in Schwarz dargestellt, polyadenylierte RNA in Rot, nicht-polyadenylierte RNA in Grün und zirkuläre RNA in Blau.

Im Jahr 2018 wurde ein neuer Weg zur circRNA-Detektion durch den Einsatz von Hybridisierungssonden beschrieben [Jiao *et al.* 2018]. Es konnte mittels DNA-basierter *molecular beacons* erfolgreich eine Model-circRNA mit miRNA-Bindepositionen detektiert werden (Abb. 2-6). Der entwickelte *molecular beacon* enthielt sowohl das Fluorophor FAM als auch den Quencher BHQ-1 und lag selbsthybridisiert vor, um das Fluoreszenzsignal zu unterdrücken. Nach Hybridisierung der DNA-Sonde mit den miRNA-Bindepositionen der circRNA wurde das Fluorophor-Quencher-Paar getrennt, was eine gesteigerte Fluoreszenz zur Folge hatte. Um das Signal weiter zu verstärken erfolgte der Abbau des DNA-circRNA-Duplexes durch die Duplex-spezifische Nuklease DSN. Diese spaltete spezifisch die DNA-Sonde, wodurch freie FAM-Moleküle entstanden [Shagin *et al.* 2002]. Anschließend konnte die freie circRNA weitere Sonden binden und deren Abbau einleiten.



**Abb. 2-6 | Darstellung der Detektion zirkulärer RNA mittels DNA-basierter *molecular beacons*.** Nach Hybridisierung der DNA-Sonden mit der circRNA (i) erfolgt der Abbau der Sonden durch die Duplex-spezifische Nuklease DSN (ii), was die Anbindung weiterer Sonden an die circRNA ermöglicht (iii).

Mit dieser neuen Methoden konnten vergleichbare circRNA-Mengen nachgewiesen werden, wie es auch über RT-PCR mit divergenten Primern möglich ist. Jedoch ist keine Unterscheidung zwischen linearen und zirkulären Transkripten durch die Sonden möglich. Daher ist der Einsatz von RNase R<sup>+</sup>-Bibliotheken unverzichtbar um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden [Jiao *et al.* 2018]. Ebenso ist ausschließlich der Nachweis von circRNAs mit bekannten miRNA-Bindestellen möglich.

**Tab. 2-1 | Vergleich gängiger Nachweismethoden für zirkuläre RNAs**

Methode	Vorteil	Experimentelle Limitierung
Bioinformatisches Sequenzscreening	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geringe Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse aufgrund spezifischer Algorithmen</li> <li>- schnelles Screening großer Datenmengen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- neue circRNA-Sequenzen nur schwer zugänglich aufgrund sehr spezifischer Algorithmen</li> <li>- Ergebnisse müssen experimentell bestätigt werden</li> </ul>
RT-qPCR mit RNase R <sup>+</sup> -Bibliotheken	<ul style="list-style-type: none"> <li>- spezifisches Signal für circRNA</li> <li>- auch wenig stark exprimierte circRNAs detektierbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- einige circRNAs sind anfällig für RNase R-Abbau</li> <li>- &lt;50 % der auftretenden circRNAs kommen in mehreren RNase R<sup>+</sup>-Ansätzen vor</li> </ul>
RT-qPCR mit Poly(A) <sup>+</sup> -Bibliotheken	<ul style="list-style-type: none"> <li>- keine RNase R-Verdau notwendig</li> <li>- nutzt die erwartete Abnahme von Sequenzmengen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- erfordert circRNA-Nachweis in Poly(A)<sup>+</sup>- und Poly(A)<sup>-</sup>-Bibliotheken</li> <li>- abweichende Ergebnisse bei weniger stark exprimierten circRNAs</li> </ul>

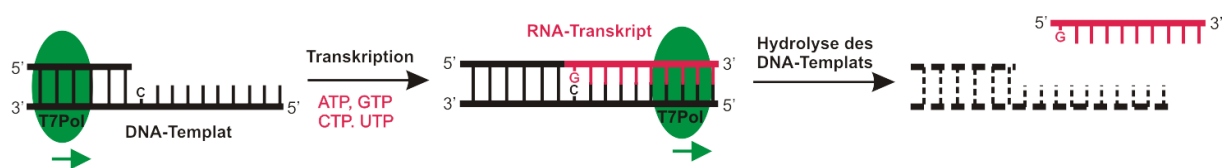
Methode	Vorteil	Experimentelle Limitierung
DNA-basierte <i>molecular beacons</i>	- direkter Nachweis von circRNAs durch Fluoreszenzzunahme - keine RT-qPCR notwendig	- RNase R <sup>+</sup> -behandelte Bibliotheken notwendig - nur miRNA-bindende circRNAs nachweisbar

Die Entwicklung dieser Sonden-basierten Nachweismethode zeigt jedoch einen positiven Trend in der Entwicklung neuer Assays für die Erforschung zirkulärer RNAs. Im Vergleich aller hier beschriebenen Methoden zeigt sich, dass kein universell einsetzbares Verfahren existiert um circRNA zu charakterisieren, da jede Methode ihre eigenen Vor- und Nachteile besitzt (Tab. 2-1). Somit ermöglicht bis zu jetzigen Zeitpunkt nur eine Kombination der unterschiedlichen Verfahren eine Untersuchung zirkulärer RNA.

## 2.4. Chemo-enzymatische Modifizierung von RNA

Die Modifizierung von RNA ist schon lange eine beliebte Methode für Funktionsuntersuchungen und Charakterisierungen. Fluoreszenzgelabelte RNAs werden zur Visualisierung und Lokalisierung *in cellulo*, aber auch in fluoreszenzbasierten Assays oder Inhibitions-Untersuchungen genutzt. Ebenso stellt die Biotin-Funktionalisierung eine Möglichkeit zur Identifizierung von Interaktionspartnern über die *pull-down*-Methode dar. Die Synthese von modifizierten RNAs erfolgt überwiegend mit der automatisierten Festphasensynthese auf Phosphoramiditbasis und der Schutzgruppe 2'-O-[(Triisopropylsilyl)oxy]methyl (TOM) [Pitsch *et al.* 1999]. Dieses Verfahren ermöglicht den ortsspezifischen Einbau von sowohl internen als auch terminalen Modifikationen durch den Einsatz von modifizierten Nukleosidbausteinen. Jedoch stellen Faktoren wie Ausbeute und Dauer der Kupplungen, sowie die anspruchsvolle Reinigung der synthetisierten RNA eine Limitation der Sequenzlänge auf ca. 50 nt dar [Stark *et al.* 2006]. Da biologisch relevante RNAs, wie prä-miRNAs oder nicht-codierende RNAs, meist wesentlich länger sind, kommen häufig enzymatische Methoden zur RNA-Synthese zum Einsatz. So ist die Verknüpfung von kurzen, über Festphasensynthese hergestellten RNA-Strängen, mittels Ligasen möglich. Die am häufigsten verwendete Methode stellt jedoch die *in vitro* Transkription eines DNA-Templates mithilfe von RNA-Polymerase und Ribonukleosidtriphosphaten (rNTPs) dar [Milligan *et al.* 1987; Romaniuk, Uhlenbeck 1983]. Dabei wird die Sequenzinformation eines DNA-Templates in zellfreier Umgebung auf RNA übertragen (Abb. 2-7). Durch den Energiegewinn, der bei der Hydrolyse von Phosphorsäureanhydriden entsteht, werden rNTPs in 5'→3'-Richtung

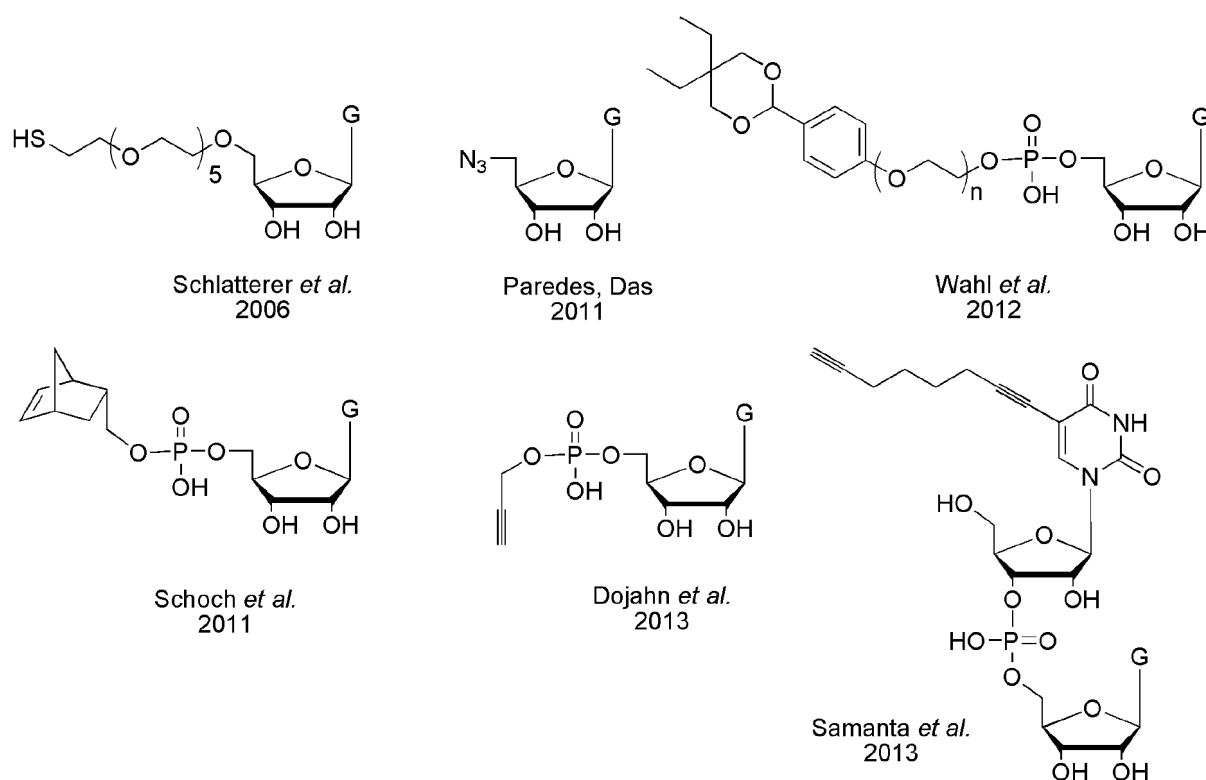
aneinandergefügt. Das verwendete DNA-Templete wird dabei in 3'-5'-Richtung transkribiert. Dabei muss das Template neben der inversen, komplementären RNA-Sequenz, auch eine doppelsträngige Promotorsequenz aufweisen, an der die Polymerase anbinden kann und die Transkription initiiert. Die T7-RNA-Polymerase stellt das am meisten verwendeten Enzym für *in vitro* Transkriptionen dar und es verwendet Klasse-III-Promotoren. Präferiert wird ein Guanosin als ersten Nukleotid einer RNA-Sequenz. Aber auch ein Dinukleotid nach dem ApG-Muster stellt ein mögliches Start-Nukleotid dar [Pitulle *et al.* 1992]. Bei Verwendung von Cytidin oder Adenosin sinkt die Transkriptionsausbeute auf 10 bis 20 % [Milligan *et al.* 1987; Milligan, Uhlenbeck 1989]. Nach Abschluss der Inkubation wird die Transkription durch Hydrolyse des DNA-Templates mittels DNase I beendet.



**Abb. 4-7 | Schematische Darstellung einer *in vitro* Transkription mittels T7-RNA-Polymerase.** Das DNA-Templete und der Promotor sind in Schwarz und das gebildete RNA-Transkript ist in Rot dargestellt.

Die Synthese von RNAs über *in vitro* Transkription ermöglicht auch den Einbau von modifizierten Starter-Nukleotiden am 5'-Terminus der transkribierten RNA (Abb. 2-8). Dabei werden Bausteine verwendet, die eine Modifizierung an 5'-Position enthalten, was den alleinigen Einbau am 5'-Terminus anstelle eines GTP zulässt. Für diesen Zweck konnten bereits modifizierte Guanosin-5'-Monophosphat-Bausteine, die über Linker mit einer Thiol- oder Amino-Funktionalität an der 5'-Position versehen wurden, erfolgreich in RNA eingebaut werden [Schlatteer, Jäschke 2006]. Nach anschließender Konjugation mit einem Maleimid- oder Aktivester-Derivat wurden die modifizierten RNAs mit Biotin funktionalisiert. Viele weitere Varianten sind bekannt, die auf die gleiche Weise eingebaut werden können. So konnte ebenfalls ein 5'-Azido-5'-Deoxy-Guanosin als *in vitro* Transkriptions-Starter verwendet werden, wobei der Einbau der Azid-Modifizierung anschließend über Verknüpfung mit einem 3'-Alkin-RNA-Oligonukleotid über kupferkatalysierte Click-Chemie und anschließender Gelanalyse bestätigt wurde [Peredes, Das 2011]. An der gleichen Position konnte eine geschützte Aldehyd-Gruppe eingebaut werden, die nach Entschützung mit einem Hydrazin-Derivat reagierte [Pfänder *et al.* 2007; Wahl, Jäschke 2012]. Auch ein Guanosin-5'-Monophosphat, dass über eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA) mit einer Norbornen-Einheit modifiziert wurde, konnte bereits erfolgreich als Transkriptions-Starter verwendet werden [Schoch *et al.* 2011]. Anschließend konnten Tetrazin-Derivate

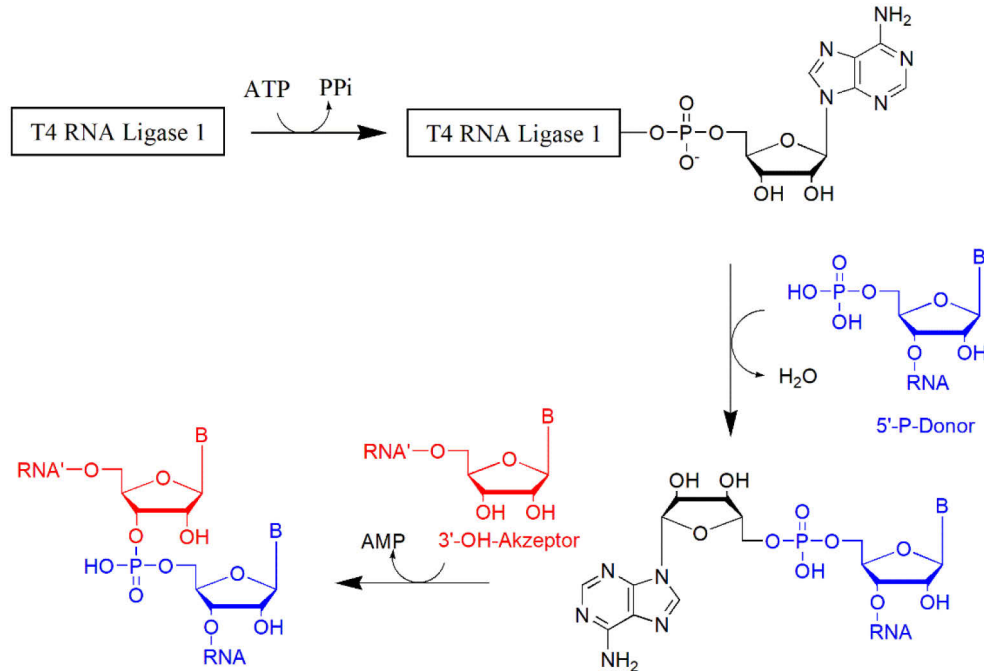
genutzt werden, um die Dienophil-modifizierte RNA mit Biotin oder Fluorophor zu funktionalisieren. Ebenso wurde ein *O*-(5'-Guanosin)-*O*-propargylmonophosphat (GMP<sup>Prg</sup>) als Transkriptions-Starter für die *in vitro* Transkription genutzt [Dojahn *et al.* 2013]. Dieses eignete sich anschließend für die Fluoreszenzmodifizierung der RNA durch kupferkatalysierte Azid-Alkin-1,3-dipolare Cycloaddition. Ebenso konnte ein Dinukleotid nach ApG-Muster mit Alkin-Linker an der 5-Position des Adenosins in eine RNA eingebaut werden [Samanta *et al.* 2013]. Auch hier erfolgte über Click-Chemie eine Funktionalisierung mittels Biotin. Diese Beispiele zeigen, dass umfangreiche Modifizierungen transkribierter RNA durch *in vitro* Transkription möglich sind. Jedoch ist der enzymatische Einbau neu entwickelter modifizierter Bausteine wesentlich schwieriger als über Festphasensynthese, da diese von der RNA-Polymerase akzeptiert werden müssen.



**Abb. 2-8 | Modifizierte Guanosin-Bausteine für den Einbau am 5'-Terminus.** Über *in vitro* Transkription können die modifizierten Guanosine zur Funktionalisierung der generierten RNA am 5'-Terminus genutzt werden.

Neben der 5'-Modifizierung einer RNA, kann auch eine Funktionalisierung des 3'-Terminus vorgenommen werden. Als Standard-Enzym für diese Zwecke hat sich die T4 RNA Ligase 1 etabliert. Dieses Enzym katalysiert, unabhängig vom Template, die Ligation einzelsträngiger 5'-Phosphat-Nukleinsäuredonatoren an 3'-Hydroxyl-Nukleinsäureakzeptoren (Abb. 2-9). Dabei kommt es erst zur Bildung eines AMP-Enzym-Komplexes unter ATP-Verbrauch und

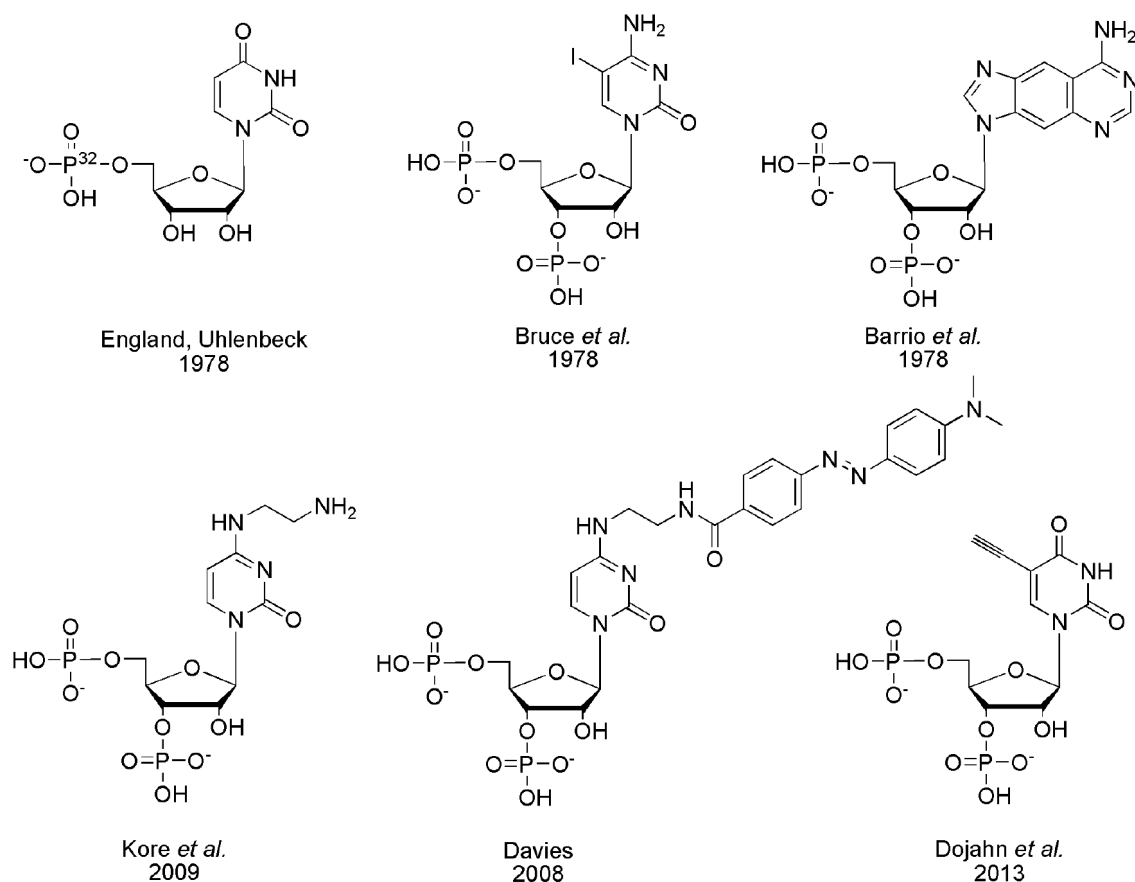
anschließend zur Übertragung des Adenosylrestes auf den 5'-Phosphat-Donor. Der dabei generierte Pyrophosphatrest kann durch den 3'-Hydroxylakzeptor angegriffen werden, was zur Bildung von AMP und einer 3',5'-Phosphodiesterbindung führt [England, Uhlenbeck 1978].



**Abb. 2-9 | Mechanismus der T4 RNA Ligase 1.** Unter ATP-Verbrauch wird eine 3',5'-Phosphodiesterbindung gebildet.

Die T4 RNA Ligase 1 kann neben natürlichen Nukleotiden auch modifizierte Bausteine an RNA ligieren. Die einzigen Voraussetzungen dafür sind eine freie 3'-Hydroxylgruppe am RNA-Akzeptor und ein 5'-Monophosphat am modifizierten Baustein mit einer Funktionalisierung die vom Enzym akzeptiert wird. Relativ schnell etablierte sich die  $^{32}\text{P}$ -Markierung von RNA mit diesem Enzym [England, Uhlenbeck 1978] (Abb. 2-10). Darüber hinaus konnte bereits ein ( $^{125}\text{I}$ )-markiertes 5-Iodocytidin-3',5'-bisphosphat erfolgreich für die Funktionalisierung des 3'-Endes verwendet werden [Bruce *et al.* 1978], sowie andere modifizierte 3',5'-Bisphosphat-Bausteine, wie beispielsweise ein 3',5'-bisphosphoryliertes lin-Benzoadenosin, welches nach erfolgreichen Einbau fluoreszierend angeregt werden konnte [Barrio *et al.* 1978]. Auch die Verwendung von C4 modifizierten Cytidin-5'-Monophosphaten ist bekannt, die sowohl Amin-, als auch Biotin-Funktionen aufweisen [Kore *et al.* 2009]. Neben diesen Bausteinen sind verschiedene pCp- und pUp-Derivate bekannt, die bereits erfolgreich in verschiedenen prä-miRNAs eingebaut wurden [Davies 2008]. Dieser Ansatz wurde weiterentwickelt und ein C5 Alkin-modifiziertes pUp (3',5'-O,O-Bisphosphat-5-ethynyluridin) etabliert, das ebenfalls am 3'-Terminus durch T4 RNA Ligase 1 eingebaut werden konnte. Eine anschließende Dephosphorylierung des 3'-Terminus ermöglichte die Ligation einer weiteren

RNA, was eine interne RNA-Modifizierung zuließ. Abschließend konnte über CuAAC mit Azid-Derivaten, eine beliebige Funktionalisierung der RNA vorgenommen werden [Dojahn *et al.* 2013].



**Abb. 2-10 | Funktionalisierte Nukleotid-Bausteine für die post-transkriptionale Modifizierung von RNA am 3'-Terminus.**

Eine Vielzahl von modifizierten Bausteinen enthalten Alkin- und Azid-Funktionalitäten. Daher ist die Click-Chemie eine gängige Methode zur post-synthetischen Modifizierung von RNA. Azide und Alkine sind abiotisch und können chemoselektiv miteinander in wässrigen Medien reagieren. Der Begriff Click-Chemie wurde 2001 eingeführt und beschreibt eine Methode mit modularer Anwendbarkeit, hohen Ausbeuten und geringen bzw. gut abtrennbaren Nebenprodukten [Kolb *et al.* 2001]. Die wohl beliebteste Methode zum RNA-Label stellt die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) dar [Rostovtsev *et al.* 2002]. Diese Reaktion beruht auf der regioselektiven Wirkung des Kupfer(I) in Richtung 1,4-disubstituierter 1,2,3-Triazole und nicht des 1,5-Regioisomeres. Die Schwierigkeit liegt jedoch im Auftreten von kupfervermittelten Strangbrüchen bei der verwendeten RNA [Stern *et al.* 1990]. Daher wird die CuAAC in Kombination mit RNA nur in Anwesenheit kupferstabilisierender Liganden, wie beispielsweise THPTA oder TBTA, durchgeführt, was



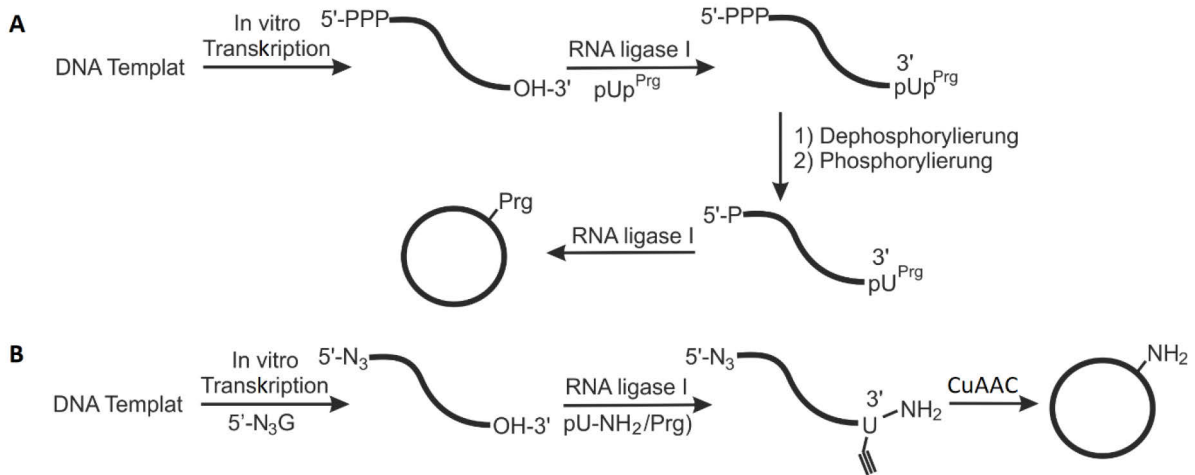
eine Unterdrückung des RNA-Abbaus bewirkt [Chan *et al.* 2004; El-Sagheer, Brown 2010]. Dies wird durch deren 1,2,3-Triazoleinheit bewirkt, welche das Kupfer(I) durch Komplexbildung stabilisiert und radikalbildende Nebenreaktionen minimiert [Chan *et al.* 2004]. Zusätzlich verstärken die tertiären Amine die Elektronendichte am Metall und beschleunigen somit die Reaktion.

### 3. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer universell einsetzbaren Methode zur Funktionalisierung zirkulärer Ribonukleinsäuren. Ein geeignetes Mittel hierfür sind chemo-enzymatische Methoden, da sie minimale Modifizierungen und eine Positionskontrolle in der RNA erlauben. So können Fluoreszenzmarkierungen erfolgen, aber auch Biotinylierungen zum Separieren von RNA-Interaktionspartnern vorgenommen werden. Eine besondere Herausforderung stellt jedoch die interne Funktionalisierung der RNA da, welche für zirkuläre RNA unerlässlich ist.

Es waren zwei unterschiedliche Wege für die Funktionalisierung von RNA vorgesehen. Die erste Methode sollte über eine Zyklisierung mit T4 RNA Ligase 1 verlaufen (Abb. 3-1 A). Dafür war der Einbau eines 5',3'-diphosphorylierten Nukleotids mit Basenfunktionalisierung mittels T4 RNA Ligase 1 erforderlich. Nach erfolgreicher Dephosphorylierung des 3'- und Monophosphorylierung des 5'-Endes wäre somit eine Zyklisierung über T4 RNA Ligase 1 durchführbar. Die Herausforderung bei dieser Methode war jedoch der quantitative Einbau des modifizierten Nukleotids, da die RNA Ligase auch unmodifizierte RNA zyklisieren kann und somit ein Gemisch aus modifizierter und nicht modifizierter circRNA entsteht. Der zweite Weg beruhte auf dem Einbau eines 5'-Azid-modifizierten Nukleotids auf Basis der *in-vitro*-Transkription, sowie eines 3'-Alkin-modifizierten Nukleotids mittels T4 RNA Ligase 1. Anschließend sollte eine Zyklisierung durch CuAAC erfolgen (Abb. 3-1 B). Vorausgegangene Arbeiten befassten sich bereits mit der 3'-Azid-Modifizierung von RNA. So konnte bereits der Einbau eines 3'-Alkin-modifizierten Nukleotids gezeigt werden [Dojahn *et al.* 2013]. Ebenso ist der Einbau eines 5'-Azid-modifizierten Bausteins durch *in-vitro* Transkription bereits bekannt [Lee HY *et al.* 2012]. Beide Techniken wurden jedoch nur mit RNAs unter 80 nt durchgeführt. Da aber natürliche circRNAs in der Regel viel größer sind, bestand die zusätzliche Herausforderung darin, diese Methoden weiterzuentwickeln, sodass sie auch auf deutlich größere RNAs übertragbar sind. Dafür sollte die zirkuläre RNA CRKL (466 nt) verwendet werden, die auf dem gleichen Genabschnitt liegt, wie ein mit Lungenkrebs in Verbindung stehendes Onkogen [Kim YH *et al.* 2010]. Neben den terminalen Modifikationen war auch die finale Click-Zyklisierung der Alkin- und Azid-Funktionalitäten von entscheidender Bedeutung. Dabei war neben der eigentlichen Click-Reaktion das Zusammenbringen der modifizierten terminalen Enden entscheidend.

## Zielstellung



**Abb. 3-1 | Konzepte zur Synthese modifizierter circRNA. (A)** Generierung einer 5'-mono-phosphorylierten RNA mit 3'-Hydroxylgruppe und Alkinmodifizierung zur Zyklisierung über enzymatische RNA-Ligation. **(B)** Bildung einer Amin-modifizierten circRNA über CuAAC.

Im Verlauf der Arbeiten kam es oft zu Schwierigkeiten beim Nachweis der Zirkularität generierter RNAs. Daher wurde die Zielstellung um eine eindeutige Nachweismethode für circRNA erweitert. Der Grundgedanke war der Einsatz eines *rolling circle*-Amplifizierungsmechanismus zur Bestätigung der Zirkularität.

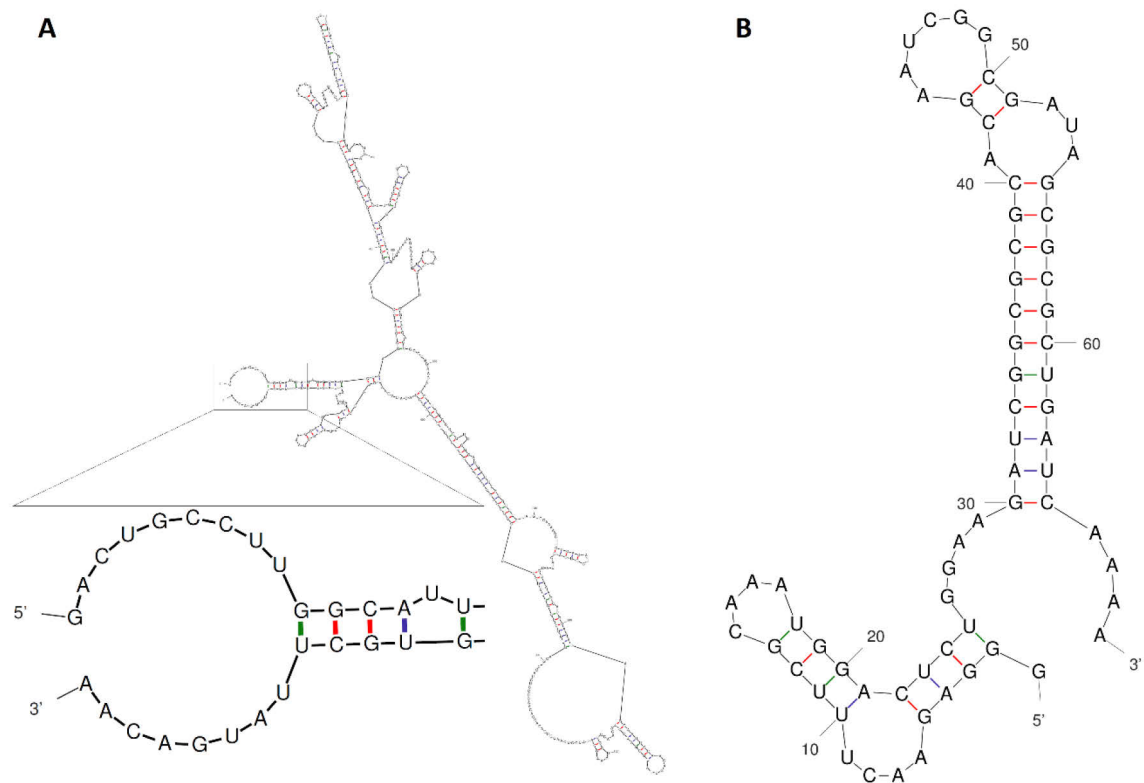
## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Interne Modifizierung von zirkulärer RNA

Obwohl die Untersuchung von zirkulärer RNA auf zellulärer Ebene ein stetig wachsendes Feld in der RNA-Forschung darstellt, gibt es große Schwierigkeiten bei der praktischen Durchführung. So basieren die meisten gängigen Methoden auf Sequenzierung oder RT-PCR-Amplifikation um RNA spezifisch in Zelllinie zu identifizieren. Allerdings wird damit nur auf das Vorhandensein von zirkulären RNAs geprüft, nicht jedoch auf deren Funktion. Gerade bei der Funktionsproblematik können intern modifizierte zirkuläre RNAs ein neuer und geeigneter Lösungsansatz sein. So kann beispielsweise eine Biotin-funktionalisierte zirkuläre RNA genutzt werden, um natürliche Bindungspartner der RNA aus Zelllysaten zu identifizieren, was wiederum Rückschlüsse auf die Funktion der zirkulären RNA zulässt. Aber auch Fluoreszenzmarkierungen stellen eine interessante Anwendungsmöglichkeit dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl enzymatische als auch chemo-enzymatische Synthesemethoden zur Generierung von natürlicher und modifizierter zirkulärer RNA entwickelt. Auf den Einsatz von chemischen RNA-Synthesemethoden wurde verzichtet, da die meisten nicht-codierenden zirkulären RNAs aufgrund ihrer umfangreichen Größe damit nicht direkt herstellbar sind. Das trifft auch auf die verwendete, zirkuläre RNA CRKL mit einer Länge von 466 nt zu. Hier war das Ziel die Verknüpfung von CRKL mit einem modifizierten Nukleotid und einer anschließenden Ligation der 3'- und 5'-Termini (Abb. 4-1 A).

Ein Plasmid mit der Sequenz der humanen circRNA CRKL sollte als Ausgangspunkt für diese Arbeit dienen und wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Nikolaus Rajewski zur Verfügung gestellt. Die Sequenz der zirkulären RNA CRKL ist in dem CRKL-pre-mRNA-Transkript enthalten und wird durch Backsplicing und Exon-Zyklisierung gebildet [Kim YH *et al.* 2010]. Um die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zu testen und zu optimieren, wurde ein 69 nt großes RNA-Transkript entworfen (Abb. 4-1 B). Der wesentliche Unterschied zur eigentlichen 466 nt langen Ziel-RNA circCRKL ist die deutlich geringere Länge, was die praktische Handhabung der RNA bei Testreaktionen und Aufreinigungen erleichtert. Zum anderen weißt das 69mer eine deutlich andere Sekundärstruktur als das circCRKL auf, was auch in dem wesentlich kleineren Loop mit der Ligationsposition ersichtlich ist. Dies sollte zu einer geringeren Flexibilität der 3'- und 5'-Termini führen und somit die Zyklisierung mit der T4 RNA Ligase 1 erleichtern.

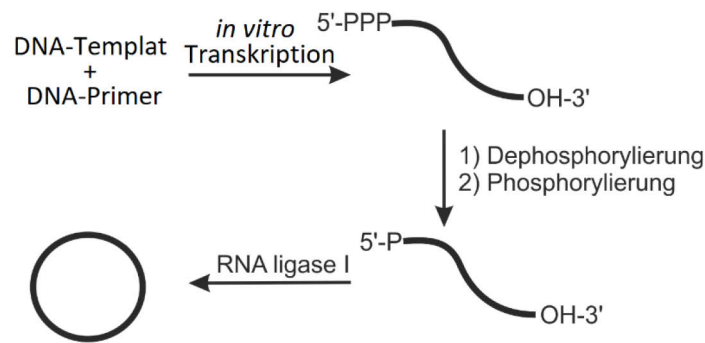


**Abb. 4-1 | Schematische Darstellung der Sekundärstrukturen der verwendeten linearen RNAs vor der Zyklisierung. (A)** Die Sequenz der linearen Form von circCRKL (466 nt) mit einem vergrößerten Ausschnitt der zu modifizierenden und zyklisierenden Loop-Ligationsstelle. **(B)** Die lineare Sequenz eines 69mers, das zu Testzwecken entworfen wurde. Die Sekundärstrukturen wurden von dem *The mfold Web Server* mit der *RNA Folding Form* erstellt.

#### 4.1.1. Zyklisierung von natürlicher unmodifizierter RNA

Zunächst wurde ein natürliches zirkuläres und unmodifiziertes CRKL-Transkript hergestellt, welches in den folgenden Experimenten als Positivkontrolle eingesetzt werden sollte. Um die Reaktionsbedingungen zu testen, wurde hierfür zunächst das kürzere 69mer verwendet. Dafür wurde eine *in vitro* Transkription mit der T7 RNA Polymerase durchgeführt (Abb. 4-2). Der Ausgangspunkt war ein DNA-Template und ein DNA-Primer, welcher bei Anbindung an das Template eine doppelsträngige Promotorregion bildet und als Startsequenz für die T7 RNA Polymerase dient. Das dabei gebildete lineare 69mer wurde mit DNase I behandelt, um das DNA-Template und den Primer zu verdauen und anschließend über Phenol-Chlorform-Extraktion von der Polymerase getrennt, sowie mittels Ethanol gefällt. Abschließend wurde die RNA über eine Filtration mit Amicon-Filter entsalzt. Dieses hergestellte 69mer verfügte, wie bei *in vitro* Transkriptionen üblich, über ein Triphosphat am 5'-Ende und konnte nicht direkt zur Zyklisierung über die T4 RNA Ligase 1 verwendet werden, da dieses Enzym nur mit

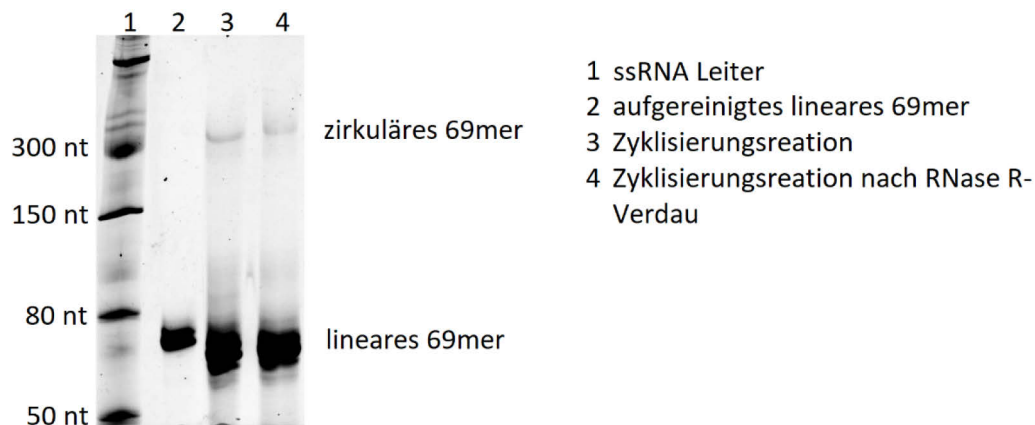
5'-monophosphorylierten Nukleotiden arbeitet. Um dieses gewünschte Monophosphat zu generieren, wurde das 69mer im zweiten Reaktionsschritt zunächst vollständig dephosphoryliert. Dies erfolgte über die CIP Dephosphorylase, ein hochaktives Enzym, welches jegliche Phosphatgruppen an sowohl 3'- als auch 5'-Termini entfernt. Nach dieser Reaktion wurde das dephosphorylierte 69mer mit Ethanol gefällt und anschließend über einen Amicon-Filter entsalzt. An dieser Stelle war eine Gelaufreinigung zwingend erforderlich, da es im dritten Schritt zu einer 5'-Monophosphorylierung über die Polynukleotidkinase (PNK) kam und kleinste Rückstände der hoch aktiven CIP Dephosphatase dies verhindern können. Nach abgeschlossener Phosphorylierung des 69mers, wurde dieses über Phenol-Chloroform-Extraktion, Ethanolfällung und Amicon-Filtration gereinigt und für Zyklisierungsversuche verwendet.



**Abb. 4-2 | Prinzip der Synthese natürlicher zirkulärer RNA über die RNA Ligase 1**

Die Zyklisierung des 5'-monophosphorylierten 69mers sollte über die T4 RNA Ligase 1 erfolgen. Diese Ligase weist eine hohe Flexibilität bei den Ligationspartnern auf. So können neben RNA-RNA- auch RNA-DNA-Verknüpfungen erfolgen. Zudem wurde dieses Enzym bereits für die Ligation von modifizierten Nukleotiden mit linearen RNAs verwendet [Dojahn *et al.* 2013], was die T4 RNA Ligase 1 gerade im Hinblick auf die noch folgende Zyklisierung von modifizierten RNAs interessant macht. Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz der T4 RNA Ligase 1 war jedoch eine einzelsträngige Ligationsstelle in der RNA, da keine Ligation im Doppelstrang stattfindet. Daher wurde auch beim Design des 69mers darauf geachtet, dass die freien Termini in einem Loop liegen. Die Zyklisierung des 69mers wurde mit 2,5 U T4 RNA Ligase 1 unter Standardbedingungen durchgeführt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Bei der anschließend durchgeführten Gelanalyse konnte, neben dem 69mer, eine Bande identifiziert werden, die sich im Gel wie eine RNA mit einer Größe von über 300 nt verhielt (Abb. 4-3). Über die Software Image Lab (BioRad) wurde die Bandenintensitäten bestimmt und ins Verhältnis gesetzt, was eine Reaktionsausbeute von 6 % ergab.

Um zu prüfen, dass es sich bei dieser Bande um die zirkuläre Form des 69mers handelte, wurde ein Verdau mit RNase R durchgeführt. Dieses Enzym baut ausschließlich lineare und keine zirkuläre RNA ab. Dabei musste jedoch festgestellt werden, dass die RNase R keine Aktivität im RNA-Gemisch zeigte. Auch große RNase-Mengen bis zu 20 U zeigten keinen Effekt auf das RNA-Gemisch, was darauf schließen ließ, dass das Enzym fast vollständig inhibiert wurde. Eine mögliche Ursache hierfür könnten Pufferrückstände oder ATP aus der Ligationsreaktion sein, was zur Deaktivierung der RNase führte. Aufgrund der geringen Ausbeute an gebildeter RNA, war eine vollständige Aufreinigung über beispielsweise Gelelektrophorese nicht möglich. Somit war die RNase R keine Option für eine Überprüfung auf Zirkularität. Daher wurde ein Assay entwickelt, der trotz dem Vorhandensein von großen Mengen linearer RNA, ein eindeutiges Signal für zirkuläre RNA erzeugt. Unter Zuhilfenahme dieser Prüfmethode konnte die gebildete RNA als zirkuläres 69mer identifiziert werden. Dieser Assay wird im zweiten Teil dieser Arbeit ausführlich besprochen (Abschnitt 4.2).



**Abb. 4-3 | Zyklisierungsreaktion des 69mers mit T4 RNA Ligase 1.** 12%ige PAGE von der Zyklisierung des 5'-monophosphorylierten 69mers im Vergleich zu dem aufgereinigten dephosphorylierten linearen 69mer. Der Verdau mit RNase R zeigt keinen Effekt auf das Gemisch aus linearer und zirkulärer RNA.

Anschließend wurden Versuche unternommen, die Ausbeute von 6 % circ69mer zu erhöhen. Es erfolgten Inkubationen des 5'-monophosphorylierten 69mers mit unterschiedlichen Mengen von T4 RNA Ligase 1. Es konnte aber auch bei höheren Ligase-Konzentrationen keine Reaktionsverbesserung beobachtet werden. Stattdessen war bei einer Stoffmenge von 10 U Ligase keine Zyklisierung mehr zu verzeichnen, was auf eine Substratkonkurrenz seitens der T4 RNA Ligase 1 hindeutet.

Eine Ursache für die schlechten Zyklisierungsausbeuten könnte auch die gewählte Loop-Ligationsstelle im 69mer gewesen sein. So wies der 3'-Terminus vier einzelsträngige

Nukleotide auf, wohingegen am 5'-Ende nur eine ungepaarte Base mit benachbarter Wooble-Basenpaarung vorhanden war. Möglicherweise würde eine größere einzelsträngige Ligationssposition die Ausbeute verbessern.

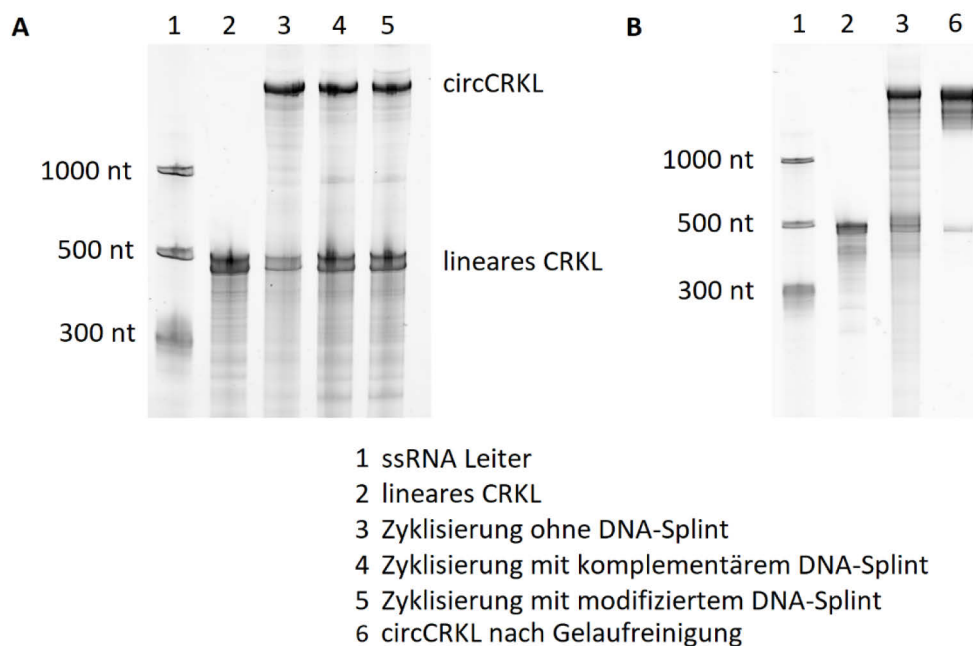
Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde auf das natürliche CRKL-Template zurückgegriffen, welches eine Ligationsstelle besitzt, die sich zentral in einem 17 nt großen Loop befindet. Hier diente ein Plasmid als Ausgangstemplate für die *in vitro* Transkription. Anschließend wurde, wie schon zuvor beim 69mer, die gleiche Aufarbeitung des linearen CRKL, mit anschließender De- und 5'-Monophosphorylierung vorgenommen. Auch hier wurde die Zyklisierung mit T4 RNA Ligase 1 durchgeführt. Dieses Vorgehen zeigte im Fall des CRKL jedoch keine Zyklisierung. Auch unterschiedliche Mengen an Enzym konnten keine Ligation hervorbringen. Somit musste festgestellt werden, dass eine Zyklisierung mit T4 RNA Ligase 1 möglich ist, aber nur in geringen Maße und auch nur für ausgewählte Sekundärstrukturen. Um das CRKL dennoch zu zyklisieren, wurde die T4 RNA Ligase 1 durch die T4 RNA Ligase 2 ersetzt. Diese Ligase ist deutlich aktiver als die Ligase 1, arbeitet jedoch nur im doppelsträngigen Bereich. Da die Ligationsstelle des CRKL in einer Loop-Region lag, war der Einsatz eines komplementären DNA-Splints erforderlich um die Termini zueinander zu bringen und einen Doppelstrang zu bilden. Der Einfluss dieses DNA-Splints sollte dabei genauer untersucht werden, indem die Ligation neben dem komplementären Splint auch ohne Splint und mit einem modifizierten Splint durchgeführt wurde (Abb. 4-4). Dieser modifizierte Splint wurde so gewählt das eine zusätzliche Base genau in der Ligationsstelle vorhanden ist, was dazu führte, dass der 3'- und 5'-Terminus des CRKL um eine Base auseinander liegen. Aufgrund dieser gewählten Bedingungen, dürfte ausschließlich die Zyklisierung mit dem komplementären DNA-Splint erfolgreich sein.



**Abb. 4-4 | Schematische Darstellung der Zyklisierung des natürlichen CRKL.** Die Ligation ohne Splint sollte nicht stattfinden, da kein Doppelstrang vorlag. Ebenso wie die Ligation mit dem modifiziertem Splint (rot), aufgrund einer zusätzlichen Base, welche die Termini trennte. Ausschließlich die Ligation mit dem komplementären Splint (grün) sollte erfolgreich verlaufen, da sich die Termini in direkter Nachbarschaft befanden.



Bei der Zyklisierung kamen 8 U T4 RNA Ligase 2 und ein 7-facher Überschuss vom DNA-Splint gegenüber des 5'-monophosphoryliertem CRKL zum Einsatz. Anschließend erfolgte die Analyse der Reaktion über Gelelektrophorese (Abb. 4-5 A). Dabei konnte die Zyklisierung des CRKLs unter allen drei gewählten Bedingungen festgestellt werden. Nach Auswertung der Bandenintensitäten wurde eine Zyklisierungsausbeute von 70 % für die Ligation ohne Splint ermittelt, wohingegen mit dem komplementären bzw. dem modifiziertem Splint nur 60 % zu verzeichnen sind. Dieses unerwartete Ergebnis deutet darauf hin, dass die T4 RNA Ligase 2 die beiden einzelsträngigen Termini des linearen CRKL selbstständig in die benötigte doppelsträngige Struktur bringt und die Ligation vermittelt. Die DNA-Splints behindern die Ligase hingegen, was in diesem Fall zu einer 10 %igen Verminderung der Ausbeute führt. Somit wurde für weitere Ligationen mit T4 RNA Ligase 2 auf den Einsatz eines DNA-Splints verzichtet. Anschließend konnte mit dem selbst entwickelten Assay die Zirkularität des CRKL-Transkripts bestätigt werden (Abschnitt 4.2).



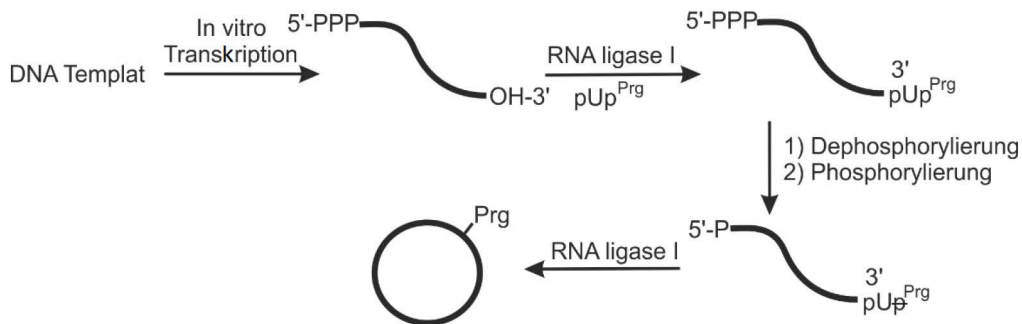
**Abb. 4-5 | Gel-Analysen der Herstellung von circCRKL. (A)** 5 %ige PAGE der unterschiedlichen Splint-vermittelten Zyklisierungsversuche von CRKL. **(B)** 5%ige PAGE zum direkten Vergleich von linearen CRKL, der Zyklisierungsreaktion ohne Splint und den aufgereinigten circCRKL.

Das hergestellte zirkuläre CRKL wurde anschließend über Gelelektrophorese von der linearen Form getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Daraufhin konnte eine erfolgreiche Aufreinigung des circCRKL mittels Gelanalyse bestätigt werden (Abb. 4-5 B). Ausschließlich eine kleine Menge von <5 % linearen CRKL war neben den circCRKL auf dem Gel zu

verzeichnen. Eine mögliche Ursache hierfür, kann die kinetische Krafteinwirkung beim Elutionsprozess sein, welche zu einem teilweisen Strangbruch der zirkulären RNA führt. Auf eine Zyklisierung des 69mers mit T4 RNA Ligase 2 wurde verzichtet, da es sich hierbei nur um ein Testkonstrukt handelte und die Zyklisierung mit T4 RNA Ligase 1 als Positivkontrolle für weitere Experimente ausreichend war.

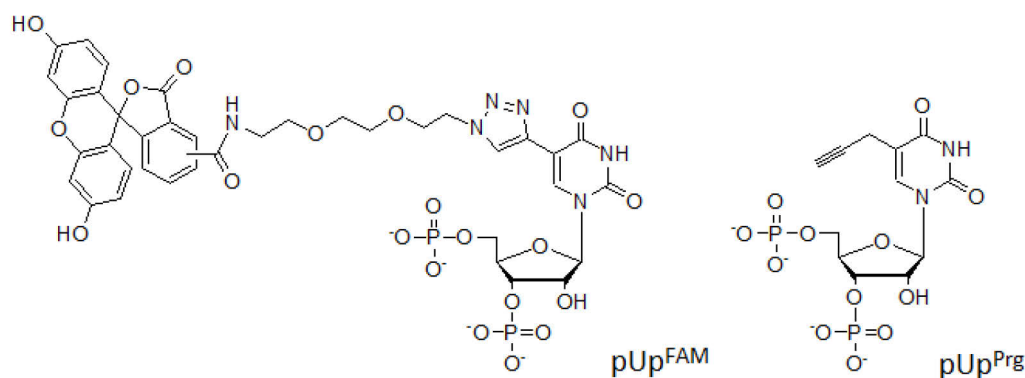
#### 4.1.2. Enzymatische Herstellung modifizierter zirkulärer RNA über T4 RNA Ligase 1 & 2

Das entworfene Protokoll zur Herstellung von zirkulärer RNA sollte nun weiterentwickelt werden, um auch die Zyklisierung von modifizierter RNA zu ermöglichen (Abb. 4-6). Dabei war neben der eigentlichen Zyklisierungsreaktion auch der Einfluss der Modifizierung auf die Ligase von besonderem Interesse. Die Modifizierung wurde sowohl mit dem 69mer als auch dem CRKL durchgeführt.



**Abb. 4-6 | Prinzip der Modifizierung und Zyklisierung von RNA über enzymatische Ligation.** Generierung einer 5'-Monophosphorylierung und einer Funktionalisierung mit dem Baustein pUp<sup>Prg</sup> am 3'-Terminus mit anschließender enzymatischen Zyklisierung über T4 RNA Ligase 1.

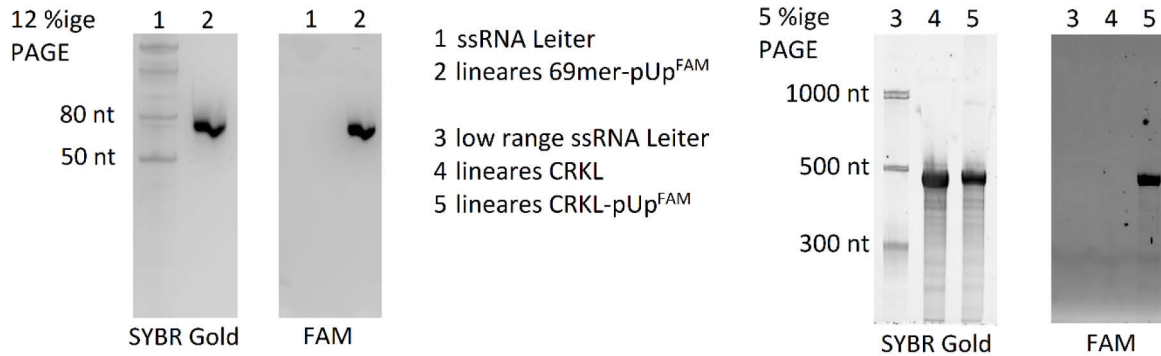
Wie schon zuvor erfolgte zunächst eine *in vitro* Transkription zur Herstellung einer 5'-triphosphorylierten linearen RNA, die standardmäßig über Phenol-Chloroform Extraktion, Ethanolfällung und Amicon Filtration aufgereinigt wurde. Anschließend sollte die RNA mit einem modifizierten Nukleotidbaustein am 3'-Terminus funktionalisiert werden. Dafür wurde zunächst das von C. Dojahn synthetisierte FAM-markierte 3',5'-*O,O*-Bisphosphatidyluridin (pUp<sup>FAM</sup>) gewählt, da es ohne weitere Reaktionsschritte eine direkte Fluoreszenzmarkierung der RNA ermöglichte (Abb. 4-7). Zudem konnte dieser Baustein bereits erfolgreich mit sehr guten Ausbeuten für eine 3'-Funktionalisierung von RNA genutzt werden (Dojahn 2012).



**Abb. 4-7 | Bausteine für die T4 RNA Ligase 1 – vermittelte Modifizierung von RNA am 3'-Terminus.** pUp<sup>FAM</sup>: FAM-markiertes 3',5'-*O,O*-Bisphosphatidyluridin. pUp<sup>Prg</sup>: 3',5'-*O,O*-Bisphosphat-5-propargyluridin.

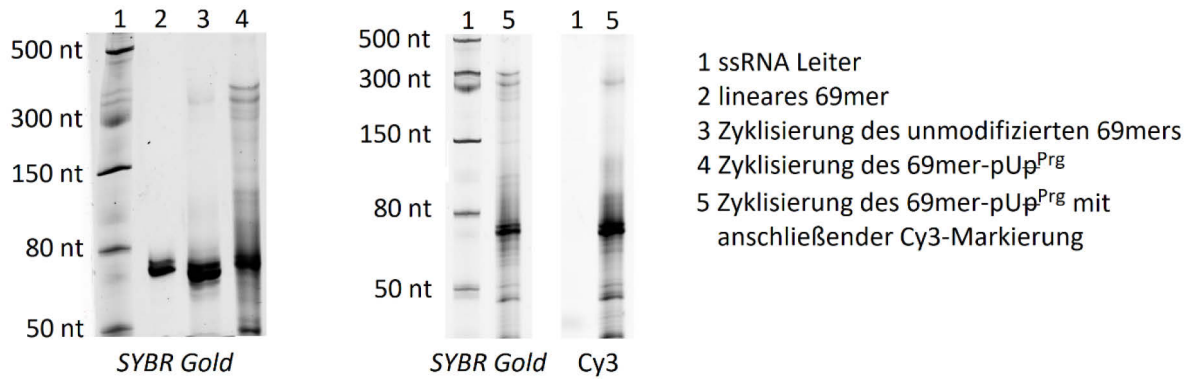
Die Ligation erfolgte nach Standardbedingungen über die T4 RNA Ligase 1. Nach einer 20-stündigen Inkubation wurde der Reaktionsverlauf mittels Gelelektrophorese kontrolliert (Abb. 4-8). Dabei wurde das Gel zweimal bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm aufgenommen. Das erste Mal um ausschließlich FAM-markierte RNA zu detektieren und anschließend erneut nach Anfärbung mit *SYBR Gold* um die gesamte RNA aufzunehmen. Dabei zeigte sich sowohl für das 69mer als auch das CRKL ein erfolgreicher Einbau des pUp<sup>FAM</sup>-Bausteins. Da sich die Bandenintensitäten vor und nach der *SYBR Gold*-Färbung kaum für die modifizierten RNAs unterschieden, konnte von einer sehr guten Ligation ausgegangen werden, was mit den von C. Dojahn ermittelten Ausbeuten (70 - 80 %) übereinstimmte. Auf eine Quantifizierung der Ligation wurde an dieser Stelle verzichtet, da zunächst überprüft werden musste, ob eine Zyklisierung mit diesem Baustein möglich ist. Dafür wurden die 3'-pUp<sup>FAM</sup>-markierten RNAs standardmäßig mit CIP dephosphoryliert, um die 5'-Triphosphate und die 3'-Monophosphatgruppen zu entfernen. Anschließend wurde über eine Gelelektrophorese aufgereinigt und das 5'-Ende mittels PNK monophosphoryliert. Daraufhin erfolgten die Zyklisierungsreaktionen. Es wurde versucht das 5'-Phosphat-3'-pUp<sup>FAM</sup>-69mer mit T4 RNA Ligase 1 und das 5'-Phosphat-3'-pUp<sup>FAM</sup>-CRKL mittels T4 RNA Ligase 2 zu ligieren. Dabei konnte jedoch keine Zyklisierung beobachtet werden. Auch führte der Einsatz größerer Mengen der Ligasen nicht zum gewünschten Ergebnis. Somit musste festgestellt werden, dass das pUp<sup>FAM</sup> sehr gut für die direkte Markierung von lineare RNA geeignet ist, aber nicht für Zyklisierungen. Eine mögliche Ursache hierfür kann eine zu große Modifizierung am Baustein sein, die zwar nicht den Einbau in die lineare RNA stört, jedoch bei der Zyklisierungsreaktion. So wird bei der Modifizierungsreaktion das 5'-Phosphatende des pUp<sup>FAM</sup> mit dem 3'-Hydroxylende der linearen RNA verknüpft. Kommt es jedoch zur Zyklisierung, muss das

5'-Phosphatende mit dem 3'-Hydroxyende des Bausteins verknüpft werden. Somit läuft die Ligase bei der Zyklisierung in 5' Richtung auf die Modifikation zu, wohingegen sie sich beim Einbau eines Bausteins in 5'-Richtung davon wegbewegt.



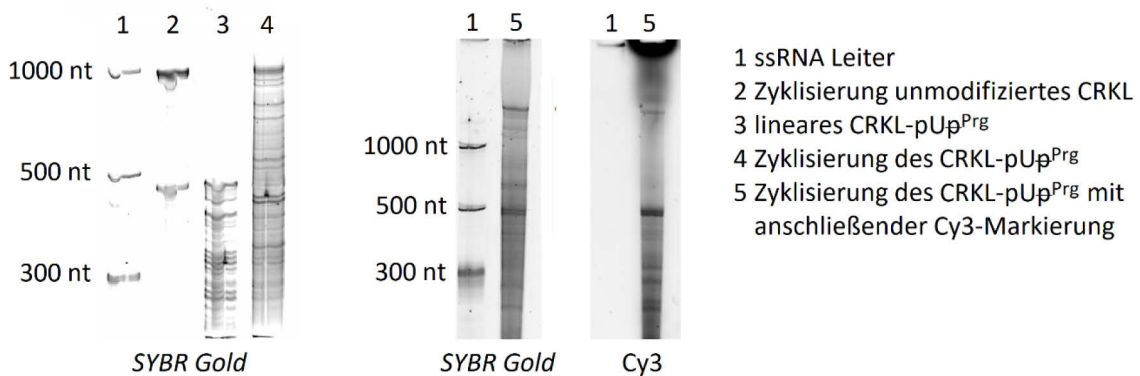
**Abb. 4-8 | 3'-Ligation von RNA mit dem Baustein pUp<sup>FAM</sup>.** 12 %ige PAGE für das 69mer bzw. 5 %ige PAGE für CRKL zur Analyse der 3'-Modifizierung mit T4 RNA Ligase 1. Die Detektion erfolgte sowohl für FAM als auch für *SYBR Gold* bei  $\lambda_{ex/em} = 470/535$  nm. Jeweils links: Gel mit *SYBR Gold*. rechts: Gel vor der Färbung mit *SYBR Gold*.

Daher sollte nun ein Baustein mit deutlich kleinerer Modifikation verwendet werden, der von C. Kimmich bereitgestellt wurde und nur eine 5-Propargylfunktionalität aufwies. Dieses pUp<sup>Prg</sup> sollte ein Überlaufen der Ligasen während der Zyklisierung ermöglichen. Zunächst wurden Zyklisierungsversuche mit dem 69mer unternommen. Die Ligation des Bausteins erfolgte wie zuvor unter Ligase 1-spezifischen Standardbedingungen für 20 h bei 16 °C mit anschließender Gelanalyse (Abb. 4-9). Dabei konnten, im Vergleich mit der Zyklisierung des unmodifizierten 69mers, zwei Banden im Bereich der zirkulären RNA identifiziert werden. Hervorzuheben ist hier, dass zwei Banden auftraten, wohingegen zuvor nur eine Bande mit dem unmodifizierten circ69mer gebildet wurde. Es traten neben den linearen und circ69mer RNAs noch weitere Banden auf, die auch deutlich kleiner waren als das lineare 69mer. Die wies auf einen teilweisen Abbau der RNA hin. Nach Auswertung der Bandenintensitäten, konnte ermittelt werden, dass beide Banden im circ69mer-Bereich jeweils 7 % der Gesamt-RNA in der Reaktion ausmachten. Anschließend erfolgte eine Markierung des modifizierten 69mers mit einem Cy3-Alkin über CuAAC. Mit einer Gelanalyse wurde sowohl die Cy3-Markierung des linearen 69mer sowie einer der beiden Banden bestätigt. Nach genauer Auswertung der Bandenpositionen im Gel konnte die untere der beiden Banden als unmodifiziertes circ69mer bestätigt werden. Zum einen aufgrund der gleichen Position wie die Positivkontrolle und zum anderen durch das fehlende Cy3-Signal für diese Bande. Somit wurde folglich die obere der beiden Banden mit dem Cy3-Signal als das zirkuläre 69mer mit pUp<sup>Prg</sup>-Modifizierung identifiziert.



**Abb. 4-9 | Ligation des monophosphorylierten 5'-Terminus mit dem pUp<sup>Prg</sup>-modifiziertem 3'-Terminus des 69mers zur Zyklisierung.** 12%ige PAGE zur Analyse der Ligation im Vergleich mit der Zyklisierung des unmodifizierten 69mers. Die Detektion nach *SYBR Gold*-Färbung erfolgte bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm und vor der *SYBR Gold*-Färbung über Cy3-Anregung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 530/600$  nm.

Zeitgleich wurden Zyklisierungsexperimente mit dem CRKL-Transkript durchgeführt. Die Herstellung des 5'-Monophosphat-3'-pUp<sup>Prg</sup>-CRKL erfolgte analog zum 69mer. Es wurden jedoch aufgrund der sehr guten Ausbeuten an unmodifizierten circCRKL, die Zyklisierungsversuche mit T4 RNA Ligase 2 durchgeführt. Die Reaktion erfolgte für 2,5 h bei 37°C und wurde anschließend über Gelelektrophorese analysiert (Abb. 4-10).



**Abb. 4-10 | Zyklisierung des CRKL-3'-pUp<sup>Prg</sup> mit T4 RNA Ligase 1.** 5%ige PAGE zum direkten Vergleich der Zyklisierung des 5'-monophosphorylierten-CRKL-3'-pUp<sup>Prg</sup> mit dem unmodifizierten 5'-monophosphorylierten-CRKL. Die Gelanalyse erfolgte bei *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm und vor *SYBR-Gold*-Färbung über Cy3-Anregung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 530/600$  nm.

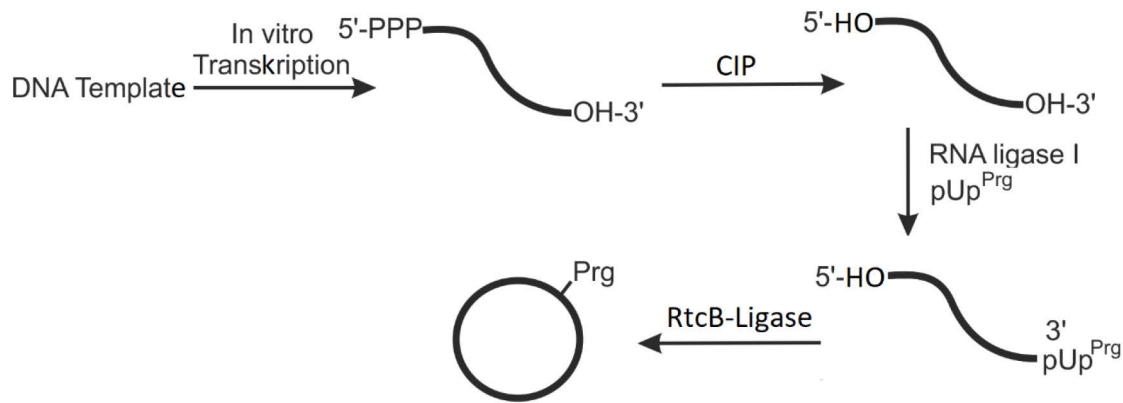
Dabei konnte die Bildung von circCRKL beobachtet werden, wie schon zuvor mit dem unmodifizierten CRKL-Transkript. Nach anfärben mit Cy3-Azid wurde auch hier eine teilweise Modifizierung der circRNA bestätigt. Es trat aber auch, wie schon zuvor beim 69mer, eine Vielzahl von Abbruchfragmenten auf. Da dieser Abbau von RNA aber erst nach Einbau den

pUp<sup>Prg</sup> auftrat, muss davon ausgegangen werden, dass der verwendete Baustein mit RNasen kontaminiert war. Aufgrund dieses Abbaus ist eine genaue Quantifizierung der Zyklisierung nicht möglich. Es ist jedoch ersichtlich, dass signifikant weniger modifiziertes circCRKL entstanden ist als unmodifiziertes.

Nach Auswertung dieser Ergebnisse kann festgehalten werden, dass die Zyklisierung von modifizierter RNA über T4 RNA Ligase 2 möglich ist, aber deutlich weniger modifizierte RNA ligiert wird als unmodifizierte RNA. Dies lässt den Schluss zu, dass die Ligase 2 nur sehr eingeschränkt mit Modifizierungen arbeiten kann. Dies bezüglich zeigt die T4 RNA Ligase 1 nahezu den gleichen Umsatz von RNA, unabhängig ob eine Modifizierung vorliegt oder nicht. Allerdings zyklisiert die T4 RNA Ligase 1 deutlich weniger Gesamt-RNA als die T4 RNA Ligase 2. Nach Auswertung aller hier erbrachten Ausbeuten, muss zu dem Schluss gekommen werden, dass eine Zyklisierung von modifizierter RNA über die T4 RNA Ligasen 1 und 2 prinzipiell möglich ist, aber nicht für die quantitative Herstellung von modifizierter circRNA genutzt werden kann. Neben der Tatsache, dass immer ein Gemisch aus modifizierter und unmodifizierter RNA auftritt, war die Gesamtausbeute der RNA zu gering um ausreichende Mengen an circRNA für eine Aufreinigung zu gewinnen. Somit war es notwendig das verwendete Protokoll für die Herstellung modifizierter circRNA zu verkürzen, um die Aufreinigungsschritte und damit einhergehend den RNA-Verlust zu minimieren.

### **4.1.3. RtcB Ligase-vermittelte Zyklisierung von modifizierter RNA**

Eine Möglichkeit für die Verkürzung des Protokolls zur Herstellung von modifizierter circRNA wurde im Einsatz der RtcB-Ligase gesehen. Diese Ligase vermittelt, wie schon die T4 RNA Ligasen, die Verknüpfung eines monophosphorylierten Terminus mit der Hydroxylgruppe des anderen Terminus. Im Gegensatz zu den T4 RNA Ligasen ist bei der RtcB-Ligase jedoch nicht von Bedeutung welcher Terminus phosphoryliert vorliegt. Diese Tatsache ermöglicht die Durchführung eines Protokolls, welches über die Ligation einer modifizierten RNA mit 3'-Funktionalisierung und Monophosphorylierung erfolgt (Abb. 4-11). Die bedeutenden Vorteile dieses Protokolls bestehen sowohl in der Verkürzung der Methode um einen Schritt, sowie der ausschließlichen Zyklisierung modifizierter RNA. Somit kann es nicht zur Bildung von unmodifizierter zirkulärer RNA als Nebenprodukt kommen. Zudem ist bekannt, dass die RtcB-Ligase in der Lage ist ssRNA zu zyklisieren [Tanaka *et. al.* 2011]. Hier bestand nun aber die Herausforderung dies auch mit modifiziertem Baustein zu erreichen.



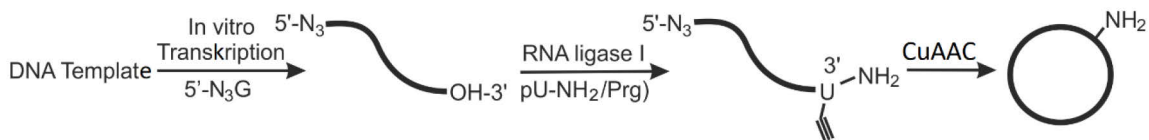
**Abb. 4-11 | Schematische Abbildung der Ligation von 3'-pUp<sup>Prg</sup>-RNA mit der RtcB-Ligase.** Nach erfolgter *in vitro* Transkription wird die RNA vollständig mit CIP dephosphoryliert, über T4 RNA Ligase 1 am 3'-Terminus mit pUp<sup>Prg</sup> modifiziert und anschließend direkt über eine RtcB-Ligase vermittelte Ligation des 3'-Phosphats mit der 5'-Hydroxylgruppe zyklisiert.

Die Zyklisierungsversuche sollten mit dem 69mer durchgeführt werden, wobei die Herstellung der RNA standardisiert über *in vitro* Transkription erfolgte. Anschließend wurde das Transkript über Gelelektrophorese aufgereinigt und direkt mit dem modifizierten Baustein pUp<sup>Prg</sup> über T4 RNA Ligase 1 verknüpft. Daraufhin wurden RtcB-Ligationen mit 1 U/μl bei 37 °C durchgeführt. Nach 2, 5 und 24 h wurden Proben genommen, um den Reaktionsverlauf über Gel-Analyse zu verfolgen. Dabei konnte jedoch keine Umsetzung des linearen 3'-pUp<sup>Prg</sup>-69mers beobachtet werden. Die Reaktion wurde mit 3 U/μl wiederholt, aber auch hier zeigte sich keine Aktivität der RtcB-Ligase. Die Gel-Analyse ist im Anhang hinterlegt (Abb. 8-1). Nach 24 h Reaktion war ausschließlich ein vollständiger Abbau der RNA zu beobachten. Dies bestätigt nochmals, dass der pUp<sup>Prg</sup>-Baustein mit RNasen kontaminiert war, was bei zu langer Inkubation zum vollständigen RNA-Abbau führte. Nach Auswertung dieser Ergebnisse musste zu dem Schluss gekommen werden, dass die RtcB-Ligase nicht mit der verwendeten modifizierten RNA arbeiten kann und somit nicht für dieses Projekt geeignet war. Daher wurde auch keine zusätzliche Zeit für weitere Untersuchungen mit der RtcB-Ligase verwendet.

#### 4.1.4. Chemische Zyklisierung von modifizierter RNA über CuAAC

Da die Zyklisierung von modifizierter RNA über enzymatische Ligation mit nur sehr geringen Ausbeuten verlief, wurde auf das von M. Hesse entwickelte Protokoll zur chemischen Zyklisierung von modifizierter RNA zurückgegriffen [Hesse 2016]. Dieses Protokoll beruht sowohl auf der Modifizierung des 5'- als auch des 3'-Terminus mit anschließender Zyklisierung

über CuAAC (Abb. 4-12). Damit kann in nur drei Schritten modifizierte circRNA hergestellt werden. Zudem bietet es den Vorteil, dass ausschließlich doppelmodifizierte RNA ligiert werden kann, wodurch unmodifizierte zyklisierte Nebenprodukte vermieden werden. Im Folgenden werden die drei Schritte zur Herstellung von modifizierten circCRKL in einzelnen Kapiteln behandeln. Von der Herstellung des CRKL-Transkripts, gekoppelt mit der Modifizierung des 5'-Terminus (Kapitel 4.1.4.1), über die Modifizierung des 3'-Terminus (Kapitel 4.1.4.2) bis zur Zyklisierung mittels CuAAC (Kapitel 4.1.4.3).



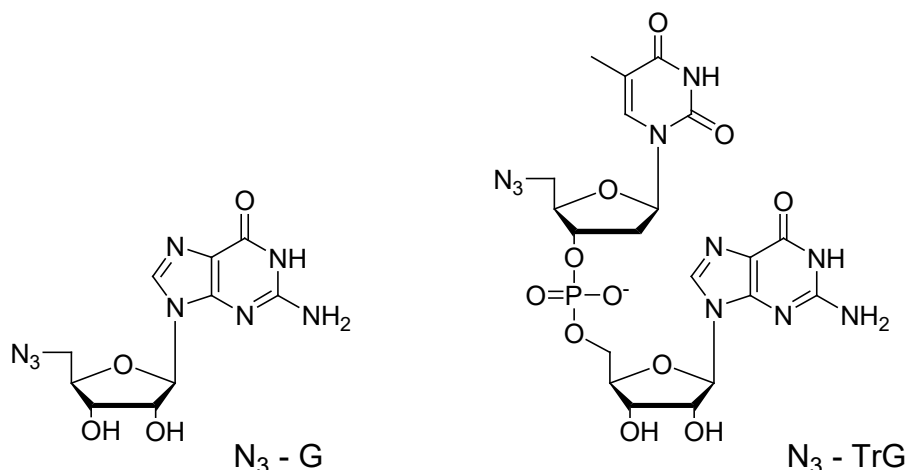
**Abb. 4-12 | Prinzip der CuAAC-vermittelten Zyklisierung von modifizierter RNA.** Während der *in vitro* Transkription wird ein modifizierter 5'-Azid-Baustein in die RNA eingebaut. Anschließend erfolgt die Ligation eines 3'-Alkin-Bausteins mit Aminfunktionalität zur postsynthetischen Modifizierung. Im finalen Schritt kommt es zur Zyklisierung der RNA über CuAAC, zur Generierung einer modifizierten circRNA.

#### 4.1.4.1. Modifizierung von RNA am 5'-Terminus durch *in vitro* Transkription

Die 5'-Modifizierung sollte direkt mit der Herstellung des linearen RNA-Transkripts über *in vitro* Transkription gekoppelt werden. Das ist ein etabliertes Vorgehen, um RNA mit modifizierter 5'-Monophosphatgruppe herzustellen [Paredes *et al.* 2011]. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass auch der Einbau eines 5'-Azido-5'-Deoxyguanosin (Azido-G) am 5'-Terminus möglich ist [Hesse 2016, Lee HL *et al.* 2012]. Daher wurde dieser Ansatz aufgegriffen und zur 5'-Azid-Modifizierung des CRKL-Transkripts genutzt. Der dafür verwendete Azido-G Baustein wurde von Dr. A. Klose-Stier synthetisiert und zur Verfügung gestellt (Abb. 4-13 links). Dabei wurde die 5'-Azidgruppe so gewählt, dass sie bei einer anschließenden Zyklisierung eine biokompatible Triazol-Verbindung bildet.

Die T7-RNA-Transkription wurde mit verschiedenen Protokollen durchgeführt, um die optimalen Reaktionsbedingungen für den Einbau des Starterbausteins Azido-G festzulegen. Dafür wurden zunächst Versuche nach der *run-off*-Methode mit dem TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (ThermoFisher) durchgeführt, wobei einmalig 1, 5 oder 10 Äq Azido-G mit konstant 1 Äq GTP zur *in vitro* Transkription gegeben wurden.

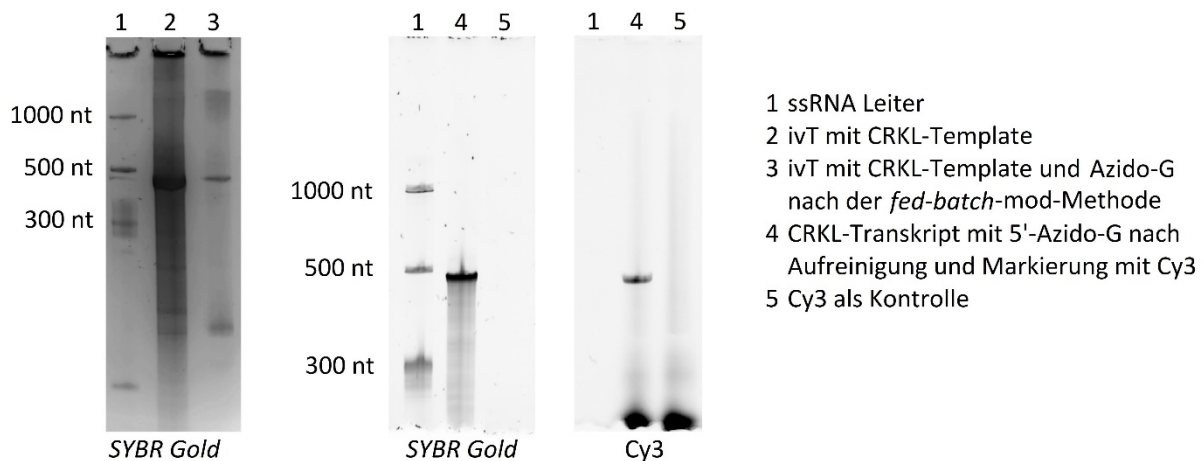




**Abb. 4-13 | Verwendete Transkriptionsstarter zur Herstellung 5'-modifizierter RNA über *in vitro* Transkription.**  $N_3$ -G: 5'-Azido-5'-Deoxyguanosin, Azido-G.  $N_3$ -TrG: 5'-Azido-Thymidin-3'-O-Guanosinmonophosphat, Azido-TrG.

Der Überschuss des Starternukleotides Azido-G sollte den Einbau begünstigen. Zum Vergleich wurde der Ansatz ohne Azido-G durchgeführt. Die Gelanalyse wurde im Anhang hinterlegt (Abb. 8-2). Daraus ist ersichtlich, dass bei den Ansätzen mit 5 und 10 Äq Azido-G eine vollständige Inhibition der T7-RNA-Polymerase vorliegt. Ausschließlich mit 1 Äq des Baustein wurde eine kleine Menge RNA gebildet, die jedoch im Vergleich mit dem Kontrollansatz ohne Azido-G zu vernachlässigen ist. Damit kann festgehalten werden, dass das Azido-G eine stark inhibierende Wirkung auf die T7-RNA-Polymerase hat. Um zu testen ob diese Inhibition polymeraseabhängig ist, wurden anstelle des *in vitro* Transkriptions-Kits von *ThermoFisher*, auch Ansätze mit dem HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit von *New England Biolabs* durchgeführt. Zudem wurde eine T7 RNA Polymerase, ausgehend von einem Plasmid der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Andreas Jäschke, exprimiert und für Transkriptionen verwendet. Jedoch konnte auch mit diesen beiden Enzymen keine Verbesserung der Reaktionsbedingungen festgestellt werden. Daraufhin erfolgten Versuche mit bis zu 20 % DMSO in den Ansätzen, da dies eine Konformationsänderung der T7 RNA Polymerase hervorruft, was bei Standard *in vitro* Transkriptionen zu einer Steigerung der Ausbeute und verringerten Bildung von Nebenprodukten führt [Chen, Zhang 2005]. Jedoch zeigte auch dies keinen Einfluss auf die *in vitro* Transkription mit dem Starterbaustein Azido-G. Somit wurde die *run-off*-Methode verworfen und es musste ein alternativer Ansatz entwickelt werden. Eine weitere Möglichkeit *in vitro* Transkriptionen mit modifizierten Startern durchzuführen ist die *fed-batch*-Methode, wobei eine definierte Menge an GTP zur Reaktion gegeben wird, welche schrittweise im Reaktionsverlauf erhöht wird. Da der Baustein Azido-G jedoch eine stark inhibierende Wirkung auf T7-RNA-Polymerasen aufwies, erschien dieser Ansatz als nicht

geeignet, da es zu einer sofortigen Inhibition kommen würde. Daher wurde ein neuer Ansatz für den Einbau des Azido-G-Bausteins entwickelt. Dieser wird hier im Weiteren als *fed-batch-mod* bezeichnet. Dieser Ansatz beruht auf der *fed-batch*-Methode, allerdings sollte hier die Azido-G-Konzentration schrittweise erhöht werden, bei gleich bleibender Menge GTP. Der Grundgedanke dieser Methode war die anfängliche Inhibition der T7 RNA Polymerase durch eine niedrige Azido-G-Konzentration zu verhindern und eine Aktivität der Polymerase zuzulassen. Die Reaktion wurde mit 0,75 mM Azido-G, 2,5 mM GTP und 10 mM der restlichen NTPs gestartet. Über 2,5 h wurde schrittweise die Azido-G-Konzentration auf final 2,75 mM erhöht. Zusätzlich lag final im Reaktionsansatz ein DMSO-Anteil von 25 % vor, da das Azido-G darin gelöst wurde. Nach Abschluss der Inkubation erfolgte wie zuvor der Verdau der DNA mittels DNase I und die Fällung der RNA mit Ethanol. Eine durchgeführte Gelanalyse bestätigte die Bildung des CRKL-Transkripts (Abb. 4-14 links). Der direkte Vergleich dieser *in vitro* Transkription mit einem Standardansatz ohne Azido-G, zeigt jedoch eine um 90 % verminderte RNA-Produktion, was ein weiteres Mal die stark inhibierende Wirkung des Bausteins Azido-G verdeutlicht.



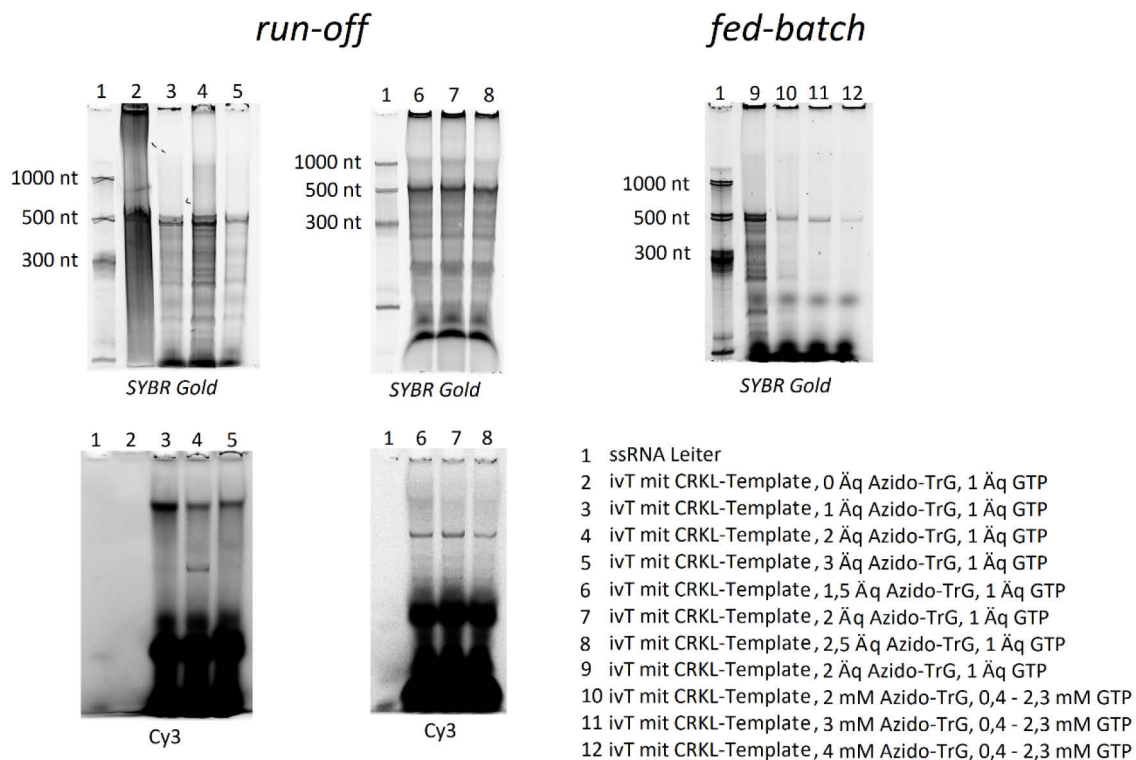
**Abb. 4-14 | *In vitro* Transkription mit CRKL-Template und dem Transkriptionsstarter Azido-G.** Direkter Vergleich der *in vitro* Transkription mit (Spur 3) und ohne (Spur 2) Azido-G nach der *fed-batch-mod*-Methode, sowie nach Markierung des modifizierten CRKL mit Cy3-Alkin über CuAAC auf 5 %igen denaturierenden Gelen. Die Gelanalyse erfolgte bei *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm und vor *SYBR-Gold*-Färbung über Cy3-Anregung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 530/600$  nm.

Um den Einbau des modifizierten Bausteins zu überprüfen, erfolgte eine Aufreinigung der hergestellten RNA über Gelelektrophorese, mit anschließender CuAAC-vermittelten Verknüpfung der RNA mit einem Cy3-Alkin (Abb. 4-14 rechts). Dabei konnte der Einbau des Bausteins Azido-G bestätigt werden. Da das Cy3-Signal jedoch deutlich schwächer war als die *SYBR Gold*-Bande, musste davon ausgegangen werden, dass nur ein teilweiser Einbau des

Bausteins Azido-G stattfand. Daher wurden Versuche unternommen, die Ausbeute der Azid-modifizierten RNA zu erhöhen. Jedoch konnten weder unterschiedliche Startrelationen von Azido-G zu GTP, noch verschiedene finale DMSO-Mengen die RNA-Bildung oder den Einbau des Azid-Bausteins steigern. Nach finaler Aufreinigung des CRKL-Transkripts ergab sich eine Ausbeute von 21 pmol für einen *in vitro* Transkriptionsansatz. Mit einem Standardansatz konnte hingegen eine Ausbeute von 140 pmol erzielt werden.

Aufgrund dieser sehr niedrigen Ausbeuten, erschien es sinnvoll einen anderen Starterbaustein für die *in vitro* Transkription zu testen. Dafür wurde das Dinukleotid 5'-Azido-Thymidin-3'-*O*-Guanosinmonophosphat (im Weiteren als Azido-TrG bezeichnet) gewählt (Abb. 4-13 rechts). Dieser Baustein wurde von Dipl. Christian Kimmich synthetisiert und basierte auf dem bekannten Dinukleotid OdUpG-Baustein, welcher bereits erfolgreich als Startnukleotid in *in vitro* Transkriptionen verwendet wurde [Samanta *et al.* 2013]. Das hier verwendete Nukleotid unterschied sich jedoch durch die 5'-Azido-Funktionalität anstelle einer Basenmodifizierung. Der Baustein Azido-TrG erschien erfolgsversprechend, da die meisten Transkriptionsstarter über modifizierte 5'-Phosphatgruppen verfügen. Bei diesem Baustein fungiert das Guanosin als Startnukleotid und mit der Phosphorsäurediesterbindung zum Thymidin, war eine Phosphatgruppe am 5'-Ende des Starters vorhanden. Damit stellt das 5'-Azid-modifizierte Thymidin nur einen Überhang da, was zu einem verringerten Einfluss auf die Polymerase führen sollte. Die Reaktionen wurden nach Vorgaben des etablierten Bausteins OdUpG nach der *run-off*-Methode mit dem TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (ThermoFisher) durchgeführt. Dabei wurden zunächst unterschiedliche Relationen von Azido-TrG zu GTP getestet. So wurde jeweils 0, 1, 2 und 3 Äq Azido-TrG bei gleichbleibender Menge von 1 Äq GTP eingesetzt und die Reaktion für 2,5 h inkubiert. Nach DNase I-Verdau und Ethanol-fällung der RNA erfolgte die Analyse der *in vitro* Transkriptionen mittels Gelelektrophorese (Abb. 4-15 oben). Beim Vergleich der Reaktionsansätze war eine Abnahme der Ausbeute an Gesamt-RNA in den Ansätzen mit Azido-TrG zu verzeichnen. Mit einer Abnahme der RNA-Menge um 60 %, zeigte dieser Baustein jedoch eine deutlich schwächere Inhibition der Polymerase als das Azido-G. Im Anschluss an die *in vitro* Transkription erfolgte die Markierung der RNA mit Cy3-Alkin, um den Einbau des Bausteins Azido-TrG zu überprüfen. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich ein Verhältnis von 2 Äq Azido-TrG zu 1 Äq GTP einen signifikanten Einbau in die RNA ermöglichte. Aufgrund dieser Beobachtung wurden zum Vergleich weitere *in vitro* Transkriptionen mit 1,5 und 2,5 Äq Azido-TrG durchgeführt (Abb. 4-15 unten, links). Mit der anschließenden Gelanalyse konnte festgestellt werden, dass sich die finale Menge an Gesamt-RNA bei 1,5 – 2,5 Äq Azido-TrG nicht unterschied. Jedoch

zeigte die Markierung mit Cy3-Alkin, dass ab 2,5 Äq ein verminderter Einbau des Bausteins in die RNA stattfand. Abschließend wurde untersucht, ob die *fed-batch* Methode bessere Ausbeuten für die *in vitro* Transkription mit Azido-TrG liefert. Dabei erfolgten Versuche mit 2-4 mM Azido-TrG und einer Startkonzentration von 0,4 mM GTP. Die GTP-Menge wurde schrittweise bis auf 2,3 mM erhöht. Nach der Gelanalyse musste jedoch festgestellt werden, dass im Vergleich mit der *run-off* Methode, eine um 60 % geringere Menge an CRKL-Transkript vorlag. Aufgrund dieser schlechten Ausbeute wurde auf weitere Experimente mit der *fed-batch* Methode verzichtet.



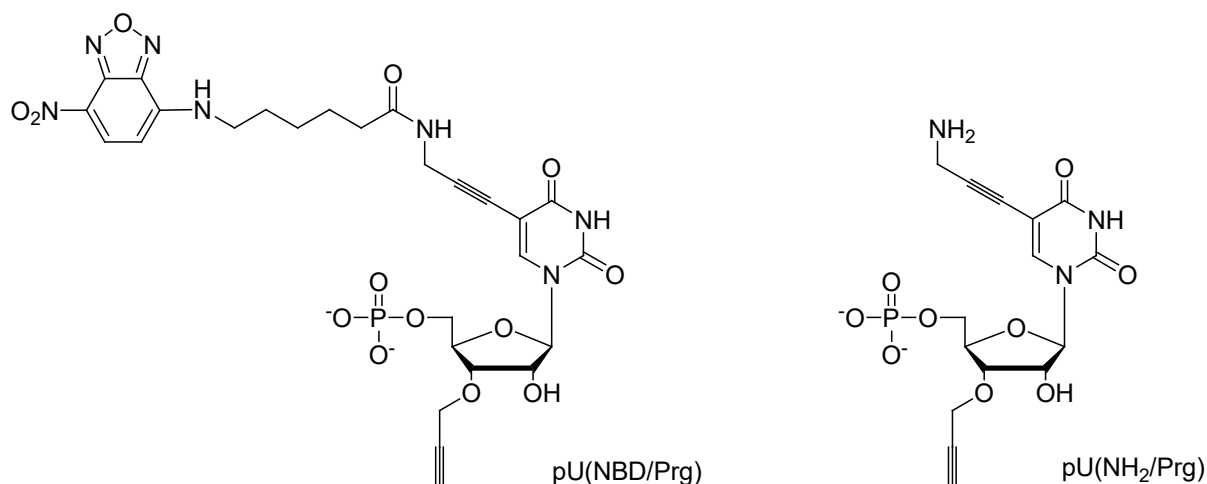
**Abb. 4-15 | *In vitro* Transkription mit dem CRKL-Template und unterschiedlichen Mengen an Azido-TrG als Transkriptionsstarter nach der *run-off* und *fed-batch* Methode.** 5 %ige denaturierende Gele zum Vergleich verschiedener Verhältnisse von GTP zu Azido-TrG. Unter allen Bedingungen kommt es zur Bildung des CRKL-Transkripts, jedoch deutlich vermindert in den *fed-batch* Ansätzen (Spur 10, 11, 12). Nur die Verhältnisse von 1,5 - 2,5 Äq Azido-TrG zu 1 Äq GTP in der *run-off* Methode zeigten nach Markierung mit Cy3-Alkin eine signifikante Menge modifiziertes CRKL (Spur 4, 6, 7, 8). Die Gelanalyse erfolgte bei SYBR Gold-Färbung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm und vor SYBR-Gold-Färbung über Cy3-Anregung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 530/600$  nm.

Diese Optimierungsversuche zeigten, dass ein Verhältnis von 2 Äq Azido-TrG zu 1 Äq GTP nach der *run-off* Methode die bestmögliche Herstellung des Transkripts mit Einbau des Bausteins Azido-TrG ermöglicht. Nach Aufreinigung des Transkriptes über Gelelektrophorese, konnte eine Ausbeute von 56 pmol RNA für einen Transkriptionsansatz ermittelt werden, was

eine Steigerung gegenüber den Versuchen mit Azido-G darstellte. Jedoch trat auch mit dem Baustein Azido-TrG eine 60 %ige Inhibition der T7 RNA Polymerase auf, was für eine qualitative Herstellung von circRNA ungünstig ist. Dennoch wurde überprüft, ob die Herstellung von funktionalisierter circRNA über dieses Protokoll möglich ist.

#### 4.1.4.2. Modifizierung von 5'-Azido-CRKL am 3'-Terminus mittels T4 RNA Ligase 1

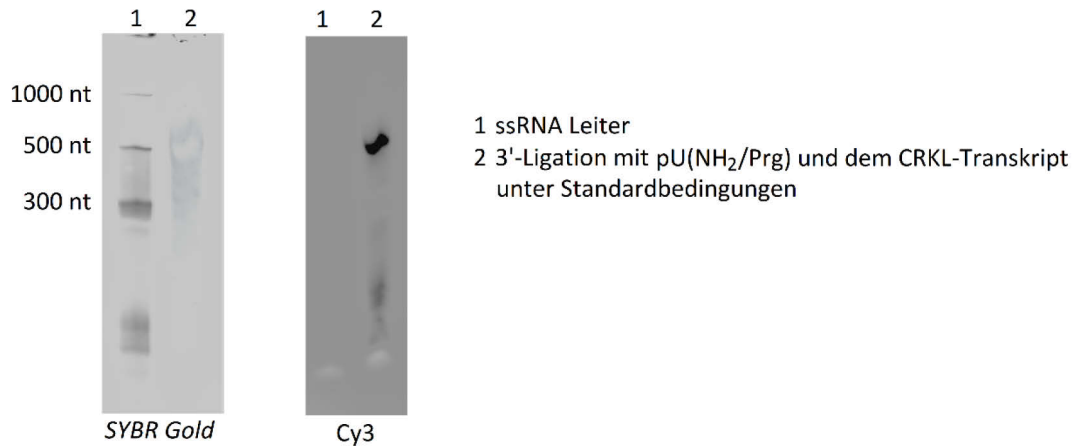
Die Modifizierung des 3'-Terminus erfolgte wie zuvor in den Kapitel 4.1.2., jedoch mit Bausteinen, die eine Propargylgruppe am 3'-Ende aufwiesen. Das war für die spätere Bildung der biokompatiblen Triazol-Verbindung zur Zyklisierung über CuAAC essentiell. Hierfür geeignet erschien der doppelmodifizierte Baustein NBD-markiertes 5'-*O*-Phosphat-3'-*O*-Propargyluridin (im Weiteren als pU(NBD/Prg) bezeichnet, Abb. 4-16 links). Der von Dipl. Christian Kimmich synthetisierte Baustein zeichnete sich neben der 3'-Propargylgruppe durch eine 5-NBD-Funktionalität aus, wodurch keine post-synthetische Modifizierung der RNA nach der Zyklisierung notwendig war.



**Abb. 4-16 | Verwendete Bausteine zur Modifizierung des 3'-Endes von RNA für CuAAC-vermittelte Zyklisierungsversuche.** pU(NBD/Prg): NBD-markiertes 5'-*O*-Phosphat-3'-*O*-Propargyluridin. pU(NH<sub>2</sub>/Prg): 5'-*O*-Phosphat-3'-*O*-Propargyl-5-Aminoethinyluridin.

Die Ligationsexperimente mit dem Baustein erfolgten wie zuvor mit der T4 RNA Ligase 1, am natürlichen CRKL-Transkript. Es wurden Konzentrationen von 0,9 – 5,5 mM des pU(NH<sub>2</sub>/Prg) eingesetzt und über 21 h inkubiert. Nach Abschluss der Ligation erfolgte eine Ethanolfällung der RNA mit Entsalzung über Amicon-Filtration. Die RNA konnte aufgrund der NBD-Markierung des ligierten Bausteins direkt über Gelelektrophorese analysiert werden (Abb. 8-3). Dabei musste festgestellt werden, dass kein NBD-Signal für markiertes CRKL auftrat. Da der

Baustein pU(NBD/Prg) selbst bei 8-fachen Überschuss (5,5 mM) gegenüber dem Standardprotokoll keinen Einbau zeigte, wurde auf weitere Ligationsexperimente verzichtet, da dies wenig erfolgsversprechend erschien. Damit war der Baustein pU(NH<sub>2</sub>/Prg) der erste, der nicht mit der T4 RNA Ligase 1 eingebaut werden konnte. Eine mögliche Ursache hierfür kann sowohl im NBD, als auch dem verwendeten Pentan-Linker liegen. Vergleicht man diesen mit dem in pUp<sup>FAM</sup> verwendeten 2-Ethoxyethan-Linker, so ist festzustellen, dass dieser unpolarer ist und damit möglicherweise schlechter mit dem aktiven Zentrum der Ligase wechselwirken kann. Um dies zu überprüfen, wurde auf die Vorstufe pU(NH<sub>2</sub>/Prg) zurückgegriffen (Abb. 4-16 rechts). Die Reaktion verlief mit 0,65 mM Baustein nach Standardprotokoll, mit Gelaufreinigung der RNA und anschließender Cy3-Markierung über CuAAC. Mit der Gelanalyse konnte ein sehr guter Einbau des Bausteins beobachtet werden. Dies bestätigte die Vermutung, dass die NBD-Funktionalisierung den Einbau in die RNA verhindert.



**Abb. 4-17 | Ligation von pU(NH<sub>2</sub>/Prg) an den 3'-Terminus des CRKL-Transkripts.** 5 %iges Gel zur Analyse der Ligation mit pU(NH<sub>2</sub>/Prg) bei 10 und 20 % DMSO. Die RNA wurde nach der Ligation über CuAAC mit Cy3-Azid markiert. Die Gelanalyse erfolgte bei *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm und vor *SYBR-Gold*-Färbung über Cy3-Anregung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 530/600$  nm.

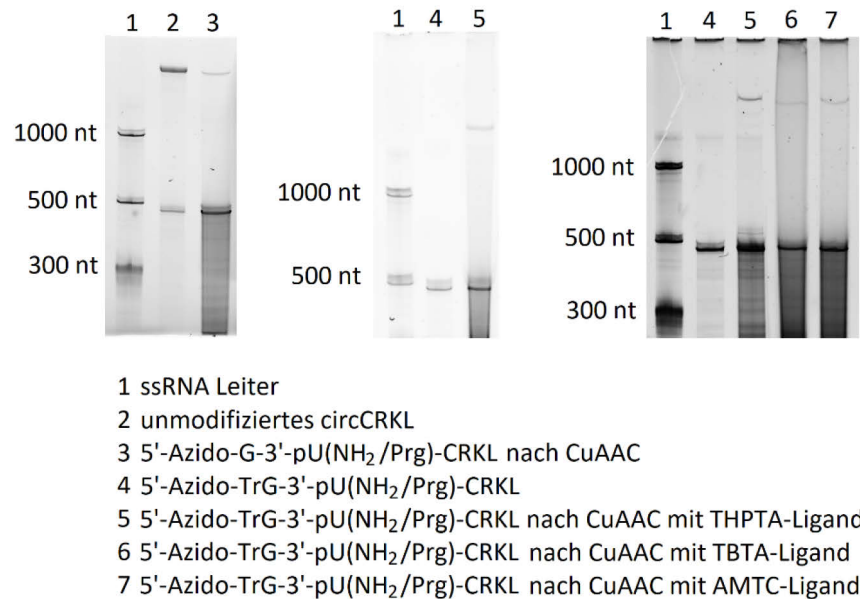
Im Weiteren wurde die Vorstufe pU(NH<sub>2</sub>/Prg) genutzt, um sowohl das 5'-Azido-G-, als auch die 5'-Azido-TrG-CRKL mit dem Baustein am 3'-Terminus zu funktionalisieren. Abschließend musste das doppeltmodifizierte CRKL über Gelelektrophorese aufgereinigt werden. Dies war ein zwingend notwendiger Schritt um nicht ligiertes pU(NH<sub>2</sub>/Prg) abzutrennen, da dieses in der folgenden Zyklisierung über CuAAC mit dem 5'-Azid reagieren könnte und damit die Verknüpfung der beiden Termini verhindern würde.

#### 4.1.4.3. CuAAC-vermittelte chemische Ligation zur Zyklisierung von RNA

Wie vorher beschrieben sollte die Zyklisierung des doppelt modifizierten CRKL über CuAAC erfolgen. Es wurden sowohl die Zyklisierung des 5'-Azido-G-, als auch des 5'-Azido-TrG-CRKL-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg) untersucht. Die gewählten Reaktionsbedingungen beruhten auf den von Dr. C. Dojahn etablierten Protokoll zur CuAAC-vermittelten Modifizierung von RNA [Dojahn 2012]. Dafür wurde die doppelt modifizierte RNA mit 5 mM THPTA, 5 mM HAsc und 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> in 1x PUS-Puffer vereint und für 2 h bei 25 °C und 250 rpm inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion erfolgte die Komplexierung des Cu<sup>I</sup> mittels 10 mM EDTA, um einen Abbau der RNA zu verhindern. Nach Abschluss der Reaktion erfolgte die Analyse der RNA über Gelelektrophorese (Abb. 4-18). Dabei zeigte sowohl das 5'-Azido-G-, als auch das 5'-Azido-TrG-CRKL-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg) eine Produktbande über 1000 nt. Dieses Produkt zeigt ein identisches Laufverhalten, wie die durch den RC-RT-PCR bestätigte circRNA CRKL. Nach Auswertung der Bandenintensitäten, konnte eine Ausbeute von 8 % circCRKL mit Azidverknüpfung für das CRKL-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg) mit 5'-Azido-G bestimmt werden. Hingegen konnte mit der 5'-Azido-TrG-RNA eine Ausbeute von 11 % erzielt werden. Die Gelanalyse zeigte jedoch auch einen signifikanten Abbau von RNA in der CuAAC-Reaktion. Die Ursache hierfür liegt im Abbau der RNA durch freies Cu<sup>I</sup>, welches die 2'-OH-Gruppen von RNA aktiviert und somit einen nukleophilen Angriff auf die benachbarten 3'-Phosphatgruppen initiiert. Um diesen Nebeneffekt des Cu<sup>I</sup> zu minimieren, wurde der THPTA-Ligand verwendet. Dieser konnte den Abbau jedoch nicht vollständig unterbinden, was einen großer Nachteil für die Zyklisierung bedeutete, da sowohl die 3', als auch die 5'-Modifikation zwingend erforderlich waren. Daher sollten weitere Liganden für die CuAAC getestet werden. Die folgenden Experimente wurden jedoch nur mit dem 5'-Azido-TrG-CRKL-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg)-Template durchgeführt, da die RNA mit 5'-Azido-G, aufgrund der geringen Ausbeuten in der *in vitro* Transkription, nur schwer zugänglich war und somit einen zu großen Materialaufwand bedeutete.

Um den Einfluss unterschiedlicher Liganden auf die CuAAC zu untersuchen, erfolgten Ansätze unter Standardbedingungen mit 5 mM THPTA, TBTA oder AMTC. Das überschüssige Cu<sup>I</sup> wurde wieder mit 10 mM EDTA nach der Reaktion komplexiert und die RNA über Gelelektrophorese analysiert (Abb. 4-18). Alle drei Liganden zeigen die Bildung der circRNA, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Dabei ist festzustellen, dass die Menge der gebildeten circRNA mit dem Ausmaß des RNA-Abbaus durch Cu<sup>I</sup> korreliert. So zeigte der Ansatz mit dem THPTA 12 % circRNA und den geringsten RNA-Abbau, wohingegen mit TBTA und AMTC Ausbeuten von nur 7 % und 9 % circCRKL erzielt wurden. Zudem ist bei diesen beiden

Liganden ein deutlich stärkerer Abbau von RNA zu verzeichnen. Daher wurde THPTA als Ligand für nachfolgende Versuche gewählt.

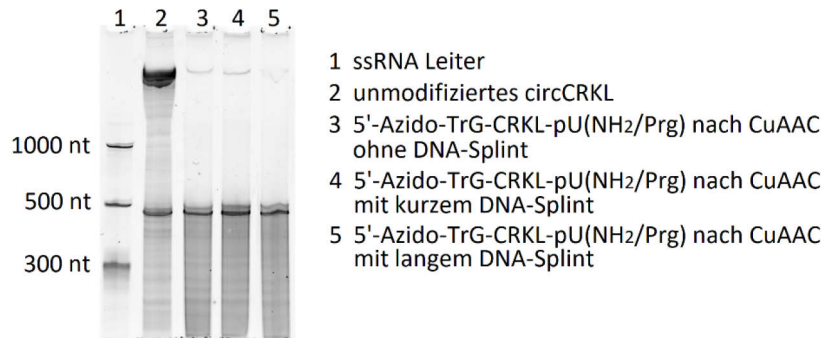


**Abb. 4-18 | Zyklisierung des CRKL-Transkripts mit 3'- und 5'-Modifizierung über CuAAC.** 5 %iges denaturierendes Gel zur Analyse der Zyklisierung des 5'-Azido-G-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg)-CRKL vor (Spur 2) und nach (Spur 3) der CuAAC, sowie vor (Spur 4) und nach (Spur 5) der Zyklisierung des 5'-Azido-TrG-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg)-CRKL. Zusätzlich wurde der Einfluss der CuAAC-Liganden THPTA, TBTA und AMTC auf die Zyklisierung des 5'-Azido-TrG-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg)-CRKL getestet (Spur 5-7). Die Detektion der Gele erfolgte über SYBR Gold-Färbung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm.

Es ist bekannt, dass die Verwendung eines DNA-Splints positive Effekte auf die Ausbeuten von CuAAC-Reaktionen mit Nukleinsäuren hat [Chen *et. al.* 2014]. Daher sollten Versuche unternommen werden, die Ausbeute an circRNA mit Triazolverknüpfung durch den Einsatz eines DNA-Splints zu erhöhen. Für diesen Zweck wurden zwei DNA-Splints unterschiedlicher Länge designt. Der kürzere der beiden Splints hatte eine Länge von 12 nt und wurde der Ligationposition im Loop des CRKLs so angepasst, dass keine Basenpaarungen mit doppelsträngigen Bereichen des CRKLs auftraten. Das sollte verhindern, dass der DNA-Splint mit der Sekundärstruktur des CRKL konkurrieren muss. Der zweite DNA-Splint mit einer Länge von 45 nt wurde hingegen so gewählt, dass er den an den Loop angrenzenden Doppelstrang des CRKLs aufricht und so eine stärkere Anbindung ermöglicht. Die Reaktionen erfolgten wie zuvor unter Standardbedingungen mit dem 5'-Azido-TrG-CRKL-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg) und 40-fachem Überschuss an DNA-Splint. Eine Reaktion ohne DNA-Splint wurde zum Vergleich ebenfalls durchgeführt. Nach anschließender Gelanalyse zeigt sich die Bildung des zirkulären CRKL mit Triazolverknüpfung in allen drei Proben (Abb. 4-19). Jedoch



zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Menge an gebildetem circCRKL. So liegt im Ansatz ohne DNA-Splint eine Ausbeute von 10 % vor, wohingegen die Reaktionen mit kurzem Splint 11 % und mit langem Splint 4 % circCRKL erbrachten. Somit trat kein Unterschied in den Reaktionen mit und ohne kurzem Splint auf, wohingegen der lange Splint die Click-Reaktion deutlich verschlechterte.



**Abb. 4-19 | Zyklisierung des 5'-Azido-TrG-CRKL-pU(NH<sub>2</sub>/Prg) unter verschiedenen Bedingungen.** CuAAC-vermittelte Reaktionen unter Standardbedingungen ohne Splint (Spur 3), mit kurzem (Spur 4) und langem DNA-Splint (Spur 5). Die Detektion der RNA erfolgte nach Markierung mit *SYBR Gold* bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm.

Die Reaktionen wurden mit bis zu 60-fachem Überschuss an DNA-Splints wiederholt, was jedoch auch keinen Effekt auf die Reaktion zeigte. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Einsatz eines DNA-Splints die Bildung des circCRKL mit Triazolverknüpfung nicht verbessert. Eine mögliche Ursache könnte das Design des CRKL-Transkripts mit der zentralen Loop-Ligationsstelle sein. Das Transkript wurde für T4 RNA Ligase-vermittelte Zyklisierungen entwickelt und nicht für chemische Ligationen. Bekannte Splint-vermittelte Reaktionen werden mit linearisierten doppelsträngigen Nukleinsäuren durchgeführt. Dadurch können die Alkin- und Azid-Bindungspartner optimal benachbart positioniert werden [Winz *et al.* 2012]. Da hier jedoch die Ligationsposition in einem Loop liegt, könnte eine Fehlstellung der Termini vorliegen, was in schlechten Ausbeuten resultiert. Zudem zeigt der Ansatz mit langem DNA-Splint eine um ca. 50 % schlechtere Bildung der circRNA. Die Ursache hierfür liegt in der stabilen Sekundärstruktur des 466 nt großen CRKL-Transkripts. Da der lange DNA-Splint in einen doppelsträngigen Bereich der Sekundärstruktur hineinragt, kommt es hier zu Verdrängungseffekten und einer Konkurrenz zwischen Splintanbindung und Sekundärstruktur. Auf weitere Optimierungsversuche wurde an dieser Stelle verzichtet, da zum einen keine guten Ausbeuten bei der Zyklisierung realisierbar waren und zum anderen nur geringe Mengen Gesamt-RNA bei der *in vitro* Transkription mit modifizierten Starternukleotid erzielt werden konnten. Damit war eine quantitative Herstellung von circCRKL mit Triazolverknüpfung nur

schwer umsetzbar und hätte für künftige biologische Anwendungen einen zu großen Materialaufwand an sowohl Enzym als auch modifizierte Bausteine bedeutet.

### 4.1.5. Zusammenfassung der Modifizierung und Zyklisierung von RNA

Im ersten Projekt dieser Arbeit sollte eine universell einsetzbare Methode zur Funktionalisierung von zirkulärer RNA etabliert werden, was in künftigen biologischen Untersuchungen zur Charakterisierung von circRNA Anwendung finden kann. Die Sequenz der humane circRNA CRKL, welche im CRKL-pre-mRNA-Transkript enthalten ist, wurde als Ausgangspunkt dieser Arbeit gewählt. Dabei wurde die verwendete Sequenz mit einer Ligationsstelle in einem 17 nt großen Loop designet, um eine enzymatische Zyklisierung zu begünstigen.

Zunächst konnte über die Bildung eines linearen 5'-Monophosphat-CRKL-Transkripts, eine nicht-modifizierte circCRKL als Positivkontrolle für weitere Experimente generiert werden. Die Zyklisierung verlief hierbei über eine Ligation der beiden Termini mittels T4 RNA Ligase 2 mit einer Ausbeute von 70 % circCRKL. Die hergestellte RNA konnte anschließend über einen entwickelten RC-RT-PCR-Assay bestätigt werden (Kapitel 4.2). Nach Abschluss der Zyklisierungsvorschrift für nicht-modifizierte circRNA, wurde das Protokoll um einen T4 RNA Ligase 1-vermittelten Ligationsschritt zum Einbau eines modifizierten Bausteins am 3'-Terminus der linearen RNA erweitert. Dabei konnte die erfolgreiche Verknüpfung von einem pUp<sup>FAM</sup>- und einem pUp<sup>Prg</sup>-Baustein mit sowohl dem CRKL-Transkript, als auch einem 69 nt großen Testtranskript gezeigt werden. Bei den abschließenden Zyklisierungsversuchen zeigte sich jedoch, dass nur das pUp<sup>Prg</sup> für die Ligationen der Termini geeignet ist. Somit konnte das modifizierte 69 nt große Testtranskript mit T4 RNA Ligase 1 und das modifizierte CRKL-Transkript mit T4 RNA Ligase 2 erfolgreich zyklisiert werden. Da jedoch die Ausbeuten an modifizierter circRNA gerade in Hinblick auf künftige biologische Untersuchungen nicht ausreichend waren, wurden weitere Protokolle zur Generierung von modifiziertem circCRKL entwickelt. Es wurden Versuche unternommen um das lineare CRKL-Transkript mit der RtcB-Ligase zu zyklisieren. Dafür wurde ein 5'-OH-CRKL mit 3'-pUp<sup>Prg</sup>-Funktionalität hergestellt und RtcB-Ligase-vermittelte Ligationsversuche unternommen. Es wurde jedoch festgestellt, dass die RtcB-Ligase nicht mit dem modifizierten 3'-Terminus arbeiten kann.

Da enzymatische Zyklisierungen keine ausreichenden Ausbeuten an modifizierten circCRKL erbrachten, wurde ein Protokoll zur chemischen Zyklisierung entwickelt. Dafür wurde ein lineares CRKL-Transkript über *in vitro* Transkription mit einem 5'-azidmodifizierten

Transkriptionsstarter hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der 5'-Azido-G-, als auch der 5'-Azido-TrG-Baustein dafür genutzt werden kann. Anschließend wurde die 3'-Modifizierung des Transkripts mit pU(NH<sub>2</sub>/Prg) erfolgreich durchgeführt. Die abschließende Zyklisierung des doppelt modifizierten CRKL-Transkripts erfolgte über CuAAC. Dabei konnte sowohl mit dem 5'-Azido-G-, als auch mit dem 5'-Azido-TrG-CRKL-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg)-Transkript die Bildung des circCRKL mit Triazolverknüpfung bestätigt werden. Es wurden Ausbeuten von 7 % circRNA für das 5'-Azido-G-, und 11 % für das 5'-Azido-TrG-Transkript ermittelt. Mit dem 5'-Azido-TrG-Transkript wurden Optimierungsversuche unternommen, um die Ausbeuten an modifiziertem circCRKL zu erhöhen. Dabei wurden unterschiedliche Liganden bei der CuAAC, als auch DNA-Splints verwendet. Dennoch konnte die maximale Ausbeute von 11 % circCRKL nicht überschritten werden. Die nicht vorhandene Steigerung der Ausbeute konnte auf das verwendete RNA-Transkript zurückgeführt werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass die Zyklisierung von modifizierter RNA erfolgreich durchgeführt werden konnte. Unter praktischen Aspekten ist jedoch eine Optimierung erforderlich. Diese kann jedoch nicht durch Splints erreicht werden, da diese die Zyklisierung stark verschlechtern. Es musste zu dem Schluss gekommen werden, dass eine chemische Ligation in einer Loop-Region bei einer RNA dieser Größe nicht sinnvoll ist, da die Sekundärstruktur zu stabil ist, um sie mit einem DNA-Splint aufzubrechen.

## 4.2. Entwicklung einer *rolling circle*-basierten Methode zum Nachweis von zirkulärer RNA

Das zweite Thema dieser Arbeit entstand aus der Notwendigkeit heraus, eine schnelle und einfache Nachweismethode für zirkuläre RNA zu etablieren. Nachdem im ersten Thema dieser Arbeit eine nicht modifizierte circRNA hergestellt wurde, war es notwendig deren Zirkularität zu bestätigen. Dies wurde zunächst über die für Gesamt-RNA etablierte Methode eines RNase R-Verdau versucht [Ashwal-Fluss *et al.* 2014]. Durch die Inkubation mit RNase R sollte kein Abbau der zirkulären RNA stattfinden, wohingegen in der Probe enthaltene lineare RNA abgebaut werden sollte. In Kapitel 4.1.1 zeigte sich jedoch, dass nach Inkubation mit RNase R kein Abbau stattfand. Ein Testversuch mit RNase R und verschiedene Mengen ATP zeigte den Grund für dieses Ergebnis. Dabei wurde das 69 nt große Testtranskript in drei Ansätzen mit RNase R verdaut, wobei im ersten Ansatz kein ATP und in den beiden anderen 0,5 mM bzw. 0,75 mM ATP zugegeben wurde. Nach Analyse der Reaktionen über Gelelektrophorese, zeigte sich eine signifikante Reduktion der RNase R-Aktivität (siehe Anhang, Abb. 8-5). So lag im Ansatz mit 0,5 mM ATP eine 50 %ige und mit 0,75 mM ATP eine 70 %ige Inhibition des Verdau vor, wohingegen ohne ATP ein vollständiger RNA-Abbau stattfand. Dieses Ergebnis zeigte wie stark die RNase R von ATP beeinflusst wurde. Da allerdings die Zyklisierung der nicht modifizierten RNA enzymatisch über T4 RNA Ligasen erfolgte, war ATP ein unverzichtbarer Bestandteil der Reaktionen. Daher wäre ein RNase R-Verdau als Nachweis der Zirkularität nur möglich, nach einer vollständigen Aufreinigung der RNA über Gelelektrophorese. Dies war jedoch zeitaufwändig und mit Materialkosten verbunden, da dies für jede Probe durchgeführt werden musste.

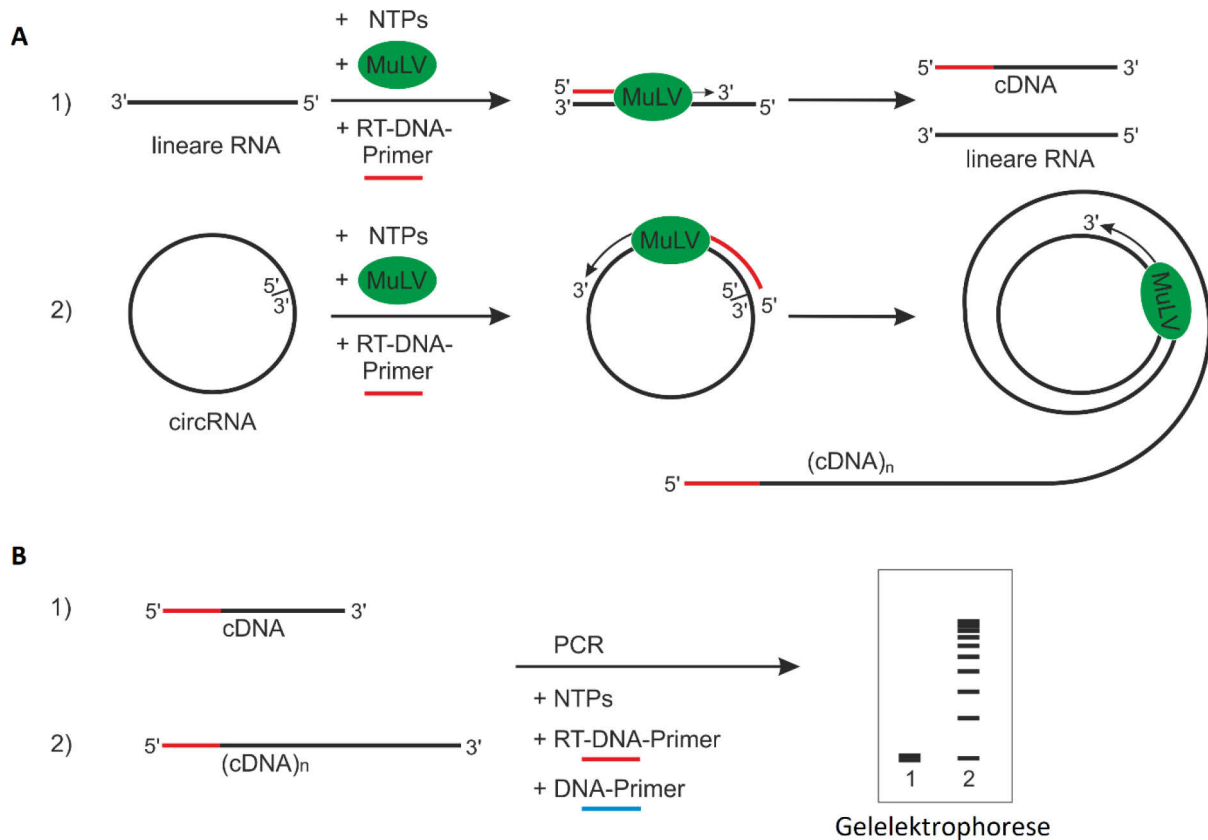
Aus diesem Grund erschien die Etablierung eines Assays sinnvoll, der circRNA trotz Anwesenheit des linearen Gegenstücks signifikant nachweisen kann. Als geeigneter Ansatzpunkt hierfür, erschien eine Veröffentlichung von S. Neubacher, bei der ein *rolling circle*-Mechanismus zum Nachweis von miRNAs genutzt wurde [Neubacher *et al.* 2011]. Dabei wurde die nachzuweisende miRNA als Primer verwendet, welcher sich an ein zirkuläres DNA-Template anlagerte und mittels Bst-DNA-Polymerase amplifiziert wurde. Aufgrund des circDNA-Templates brach jedoch die Amplifizierung nach einem Umlauf nicht ab, sondern vollzog einen *rolling circle*. Daraufhin wurde ein zweiter Primer verwendet, um eine Signalverstärkung zu induzieren. Die Idee einer *rolling circle*-Amplifizierung erschien auch für den Nachweis von zirkulärer RNA geeignet. Da hierbei jedoch eine circRNA untersucht werden sollte, bestand die Herausforderung in der Durchführung eines *rolling circle*-Mechanismus mit

einer reversen Transkriptase. Die dabei gebildete multimeren cDNA könnte anschließend über PCR amplifiziert werden, um eine Signalverstärkung zu erzielen. Um dies zu überprüfen wurde das *1st generation* Primerset entworfen.

### **4.2.1. *Rolling circle*-RT-PCR-Methode der ersten Generation zur Unterscheidung von linearer und zirkulärer RNA**

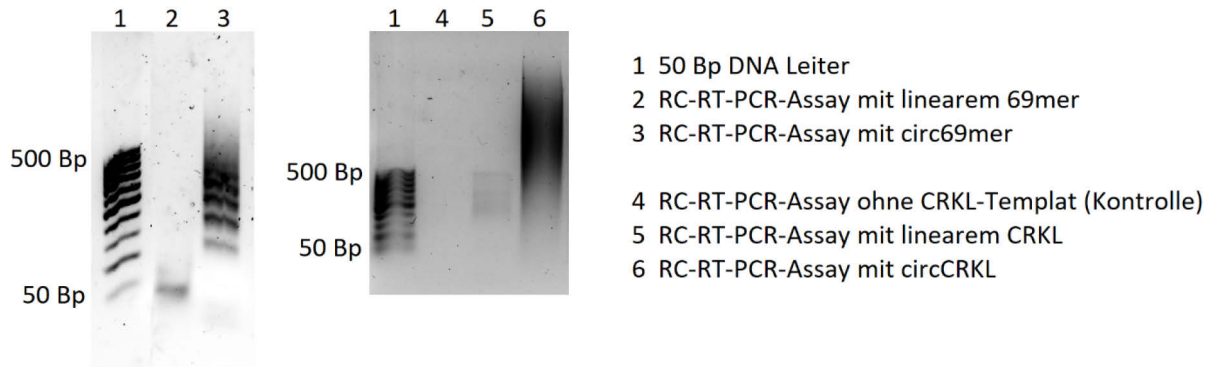
Der *rolling circle* - reverse Transkription - PCR - Assay (RC-RT-PCR-Assay) der ersten Generation wurde entwickelt, um die Zirkularität von hergestellter circRNA zu bestätigen (Abb. 4-20). Das hierfür designte *1st generation* Primerset sollte sowohl die Amplifizierung der circRNA als auch der nicht zirkulären RNA ermöglichen. Dabei sollte zunächst die zu untersuchende RNA mit dem RT-PCR-Primer über eine reverse Transkription in cDNA übersetzt werden. Bei einem linearen RNA-Template kann nur cDNA gleicher Länge gebildet werden, wohingegen ein zirkuläres Template einen *rolling circle*-Mechanismus starten sollte, was die Generierung einer multimeren cDNA ermöglicht. Da eine reverse Transkription jedoch nicht zur Amplifikation von cDNA geeignet ist, wären große Mengen RNA-Template notwendig um die gebildete cDNA nachzuweisen und zu untersuchen. Daher erschien die Durchführung einer PCR mit dem RT-PCR-Primer und einem zusätzlichen PCR-Primer als sinnvoll, um die gebildete cDNA zu amplifizieren. Bei einem linearen RNA-Template sollte somit nur die monomere cDNA amplifiziert werden. Wohingegen das zirkuläre RNA-Template, welches eine multimeren cDNA generierte, die Amplifizierung von PCR-Produkten unterschiedlicher Längen ermöglicht, von denen die kleinste Einheit das monomere PCR-Produkt darstellt. Anhand einer Gelelektrophorese zur Analyse der gebildeten PCR-Produkte, sollte ein circRNA-spezifisches Bandenmuster auftreten.

Der Assay sollte sowohl mit den zyklisierten Proben des 69 nt großen Testtranskripts (69mer) als auch des CRKL's aus Kapitel 4.1.1 etabliert werden. Dabei handelte es sich um die nicht-modifizierten circRNAs. Die ersten Experimente erfolgten mit den Zyklisierungsreaktionen. Es erfolgte keine vorherige Isolation der circRNAs, da der Assay für einen direkten Nachweis von zirkulärer RNA aus Reaktionsansätzen etabliert werden sollte. Es erfolgte zunächst die reverse Transkription mit dem *high-capacity cDNA reverse transcription kit* (ThermoFisher Scientific) und 0,5 µl aus dem Zyklisierungsansatz des 69mers bzw. des CRKLs. Dies entsprach ca. 1 pmol der RNA-Menge, welche jedoch nur teilweise zyklisiert vorlag.



**Abb. 4-20 | Schematische Darstellung des RC-RT-PCR-Assays mit linearer RNA und zirkulärer RNA als Ausgangstemplate. (A)** Generierung einer monomeren cDNA durch ein lineares RNA-Template bzw. einer multimeren cDNA durch ein circRNA-Template über reverse Transkription. Die verwendete reverse Transkriptase MuLV ist in Grün dargestellt und der RT-DNA-Primer aus dem *1st generation* Primerset in Rot. **(B)** Eine PCR mit der monomeren cDNA amplifiziert ausschließlich das monomere Produkt, wohingegen mit der multimeren cDNA verschiedene PCR-Produkte unterschiedlicher Länge gebildet werden. Der zweite DNA-Primer aus dem *1st generation* Primerset ist in Blau dargestellt und das zu erwartende Endergebnis der Gelelektrophorese ist schematisch abgebildet.

Die reverse Transkription erfolgte standardisiert nach Herstellerangaben. Ausschließlich das Reaktionsvolumen wurde von 20 µl auf 10 µl verringert. Durchgeführt wurde die Reaktion in einem Standard-PCR-Gerät. Nach Abschluss der Inkubation wurde den reversen Transkriptionsansätzen jeweils 1 µl entnommen und für PCR-Reaktionen verwendet. Diese wurde mit dem Taq PCR Kit (NEB) ebenfalls nach Herstellerangaben im PCR-Gerät durchgeführt. Nach der Inkubation erfolgte die Analyse des Assays über Agarosegele, womit der erwartete Unterschied zwischen linearer und zirkulärer RNA beobachtet werden konnte (Abb. 4-21). So generierte das lineare 69mer nach abgeschlossenen RC-RT-PCR-Assay nur ein PCR-Produkt, welches größer als 50 Basenpaare (Bp) war. Die zirkuläre Form hingegen bildete mehrere Banden über 100 Bp, wobei jedoch keine Bande für das 69 nt große Monomer auftrat.



**Abb. 4-21 | Analyse des RC-RT-PCR-Assays mit 69 nt großen Testtranskript und CRKL über 1 %ige Agarosegele.** Gegenüberstellung der linearen und zirkulären Form des jeweiligen Transkripts. Die linearen RNA-Templates des 69mers und CRKL's generieren nur das jeweilige Monomer, bzw. zusätzlich kleinere Nebenprodukte der PCR-Reaktion, wohingegen die zirkulären Templates deutlich größere PCR-Produkte amplifizieren. Detektion nach *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{ex/em} = 470/535$  nm.

Dieses Ergebnis wurde nicht erwartet, da hier mit den Zyklisierungsansätzen als Starttemplate gearbeitet wurde und vor allem das 69mer nur einen geringen Anteil an zyklisierter RNA enthielt. Dies deutet darauf hin, dass die reverse Transkriptase MuLV das zirkuläre Template priorisiert. Jedoch muss das monomere PCR-Produkt auch mit der zirkulären Form generiert werden. Dies wiederum lässt den Schluss zu, dass die hier verwendete Taq DNA Polymerase vorrangig größere PCR-Produkte generiert.

Das CRKL-Transkript, mit dem wesentlich mehr zirkuläre RNA im Ansatz generiert werden konnte, zeigte ebenso einen deutlichen Unterschied zwischen den Proben. Das lineare CRKL (466 nt) bildete im Assay nur eine gleich große DNA Bande und eine einige kleine Nebenprodukte, wohingegen das zirkuläre CRKL ein deutlich intensiveres Signal erzeugte. Dieses zeigte eine Art „Schmier“, ausgehend von den monomeren PCR-Produkten für das lineare CRKL bis zu deutlich größeren Einheiten. Es traten jedoch keine klar zu trennbaren Banden auf. Rückblickend auf die Probe mit dem zirkulären 69mer, trat auch hier ab 500 Bp ein „Schmier“ auf. Dies lässt darauf schließen, dass die verwendete Taq DNA Polymerase bei größeren DNA-Produkten ab 500 Bp mehrere Abbruchfragmente bildet, wie auch mit dem linearen CRKL-Transkript festzustellen war. Doch bereits die erste Durchführung des Assays zeigte, dass dieser für den Nachweis von circRNA in nicht gereinigten Proben geeignet ist und bestätigte die Zirkularität der Proben des 69mers und des CRKL's aus Kapitel 4.1.1.

Um die signifikante Erkennung zirkulärer RNA nochmals zu bestätigen, erfolgte ein zusätzlich Experiment mit RNase H. RNase H ist ein Enzym das RNA-DNA-Duplexe intramolekular spalten kann. Dies sollte genutzt werden, um das circCRKL bei angelagerten RT-Primer zu spalten, was im RC-RT-PCR-Assay zu PCR-Produkten mit einer maximalen Größe von 466 Bp

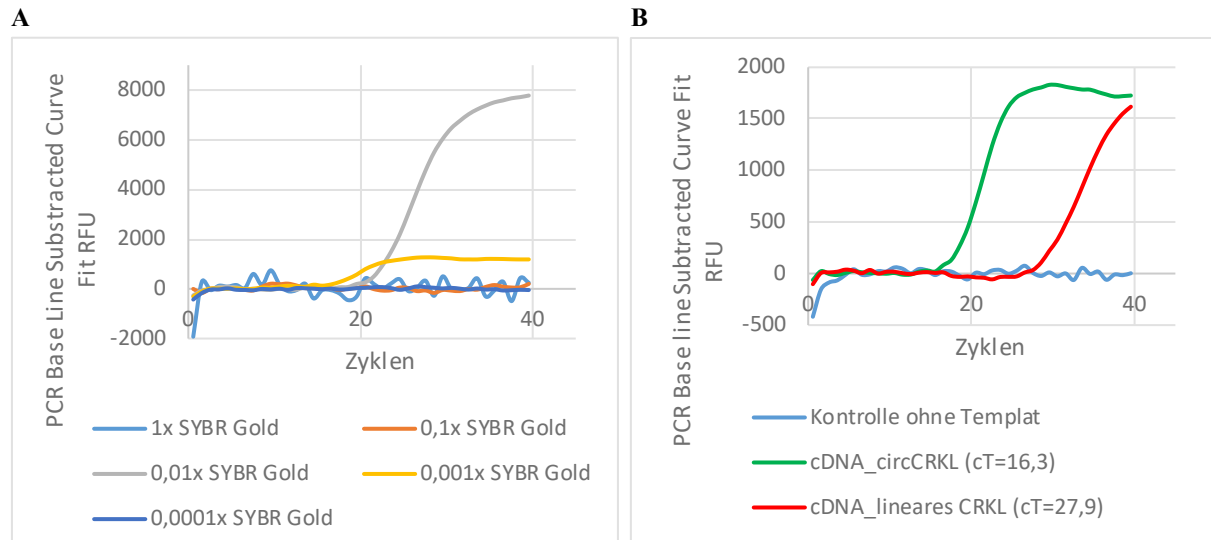
(Monomer) führt. Dafür wurden 0,1 pmol zirkuläre RNA mit 5 µM RT-Primer und 25 U RNase H für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte standardisiert die reverse Transkription mit anschließender PCR. Es wurde ein separater Ansatz ohne RNase H durchgeführt. Das Ergebnis der Reaktionen wurde mittels Agarosegel überprüft (siehe Anhang, Abb. 8-6). Dabei war festzustellen, dass mit RNase H ausschließlich PCR-Produkte unter 500 Bp auftraten. Die unbehandelte Probe zeigte hingegen, nach wie vor, den signifikanten „Schmier“ deutlich größerer PCR-Produkte. Dieses Ergebnis bestätigte nochmals den hier etablierten Assay.

Aufgrund der interessanten Anwendungsmöglichkeiten des Assays wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die Amplifikation der revers transkribierten cDNA über *real time* qPCR zu verfolgen ist. Das erforderte jedoch definierte Konzentrationen von linearer und zirkulärer RNA und da nur das CRKL-Transkript die Herstellung ausreichender Mengen circRNA für eine Aufreinigung ermöglichte, erfolgten alle weiteren Untersuchungen mit dieser RNA.

Zur Etablierung des Assays auf qPCR-Ebene, wurde zunächst, wie zuvor, die standardisierte reverse Transkription mit 0,5 pmol RNA durchgeführt. Da die gebildete Menge an cDNA zu gering für eine Quantifizierung war, wurde im Folgenden festgelegt, dass 0,1 pmol RNA über reverse Transkription gleich 0,1 pmol transkribierte cDNA generiert. Um auch weiterhin einen geringen Kosten- und Materialaufwand zu gewährleisten, sollte auch für die qPCR, das Taq PCR Kit verwendet werden. Da dies jedoch keinen Fluoreszenzfarbstoff enthielt, wurde separat *SYBR Gold* zur Reaktion gegeben. Um die optimale zu verwendende Menge *SYBR Gold* zu bestimmen, erfolgte die Durchführung von qPCR-Reaktionen mit 20 fmol transkribierter cDNA des circCRKL-Transkripts und unterschiedlicher Mengen an *SYBR Gold* (Abb. 4-22A). Dabei konnte die Menge von 0,01x *SYBR Gold* als optimal für weitere Experimente ermittelt werden. Kleinere Mengen des Fluoreszenzfarbstoffes erzeugen ein zu schwaches Signal, wohingegen der Einsatz von größeren Mengen die Taq DNA Polymerase inhibiert, was sich ebenfalls in einem schwachen Signal äußerte. Anschließend erfolgte die Durchführung des RC-RT-qPCR-Assay mit 20 fmol transkribierte cDNA, sowohl vom linearen, als auch vom zirkulären CRKL-Transkript (Abb. 4-22B). Das Ergebnis war ein cT-Wert von 16,3 für circCRKL und 27,9 für lineares CRKL. Damit konnte ein  $\Delta cT$  von 11,6 ermittelt werden. In einer Standard-qPCR entspräche das ca.  $2^{12}$  mehr gebildetes PCR-Produkt. Jedoch trifft das in diesem Fall nicht zu, da in der zirkulären Probe größere PCR-Produkte gebildet werden, die aufgrund besserer Interaktion mit dem *SYBR Gold*, einen größeren Einfluss auf die Signalstärke haben. Daher werden im Weiteren nur  $\Delta cT$ -Werte angegeben. Anschließend konnte mit den qPCR-

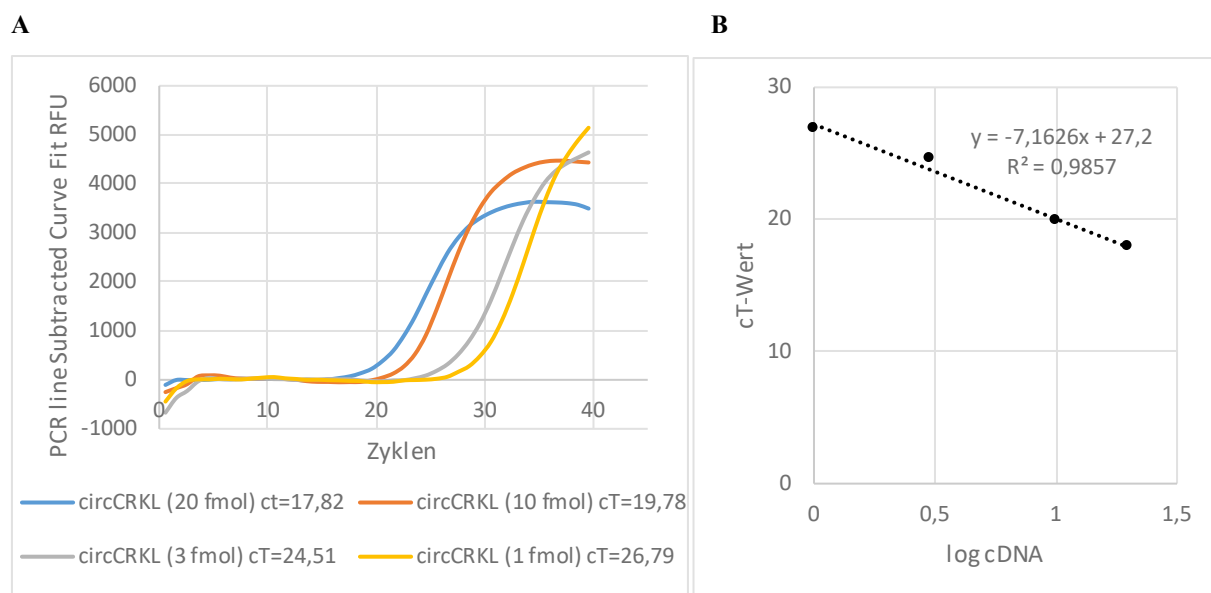


Produkten, das erwartete Bandenmuster über Gelelektrophorese bestätigt werden (siehe Anhang, Abb. 8-7).



**Abb. 4-22 | RC-RT-PCR-Assay mit 1st generation Primerset und CRKL-Transkript.** (A) Assay mit 20 fmol transkribierter cDNA vom circCRKL-Transkript mit unterschiedlichen Mengen SYBR-Gold. (B) Vergleich von zirkulären und linearen CRKL mit jeweils 17 fmol transkribierte cDNA.

Nachdem gezeigt wurde, dass der entwickelte Assay auch über qPCR durchgeführt werden kann, erfolgte die Messung einer Konzentrationsreihe mit der cDNA des circCRKL-Transkripts (Abb. 4-23A).



**Abb. 4-23 | RC-RT-qPCR-Assay der ersten Generation mit verschiedenen Mengen transkribierter cDNA des circCRKL-Transkripts.** (A) Auswertung der qPCR mit Stoffmengen von 1-20 fmol transkribierter cDNA. (B) Lineare Auftragung der ermittelten cT-Werte gegen die Logarithmen der verwendeten cDNA-Stoffmengen.

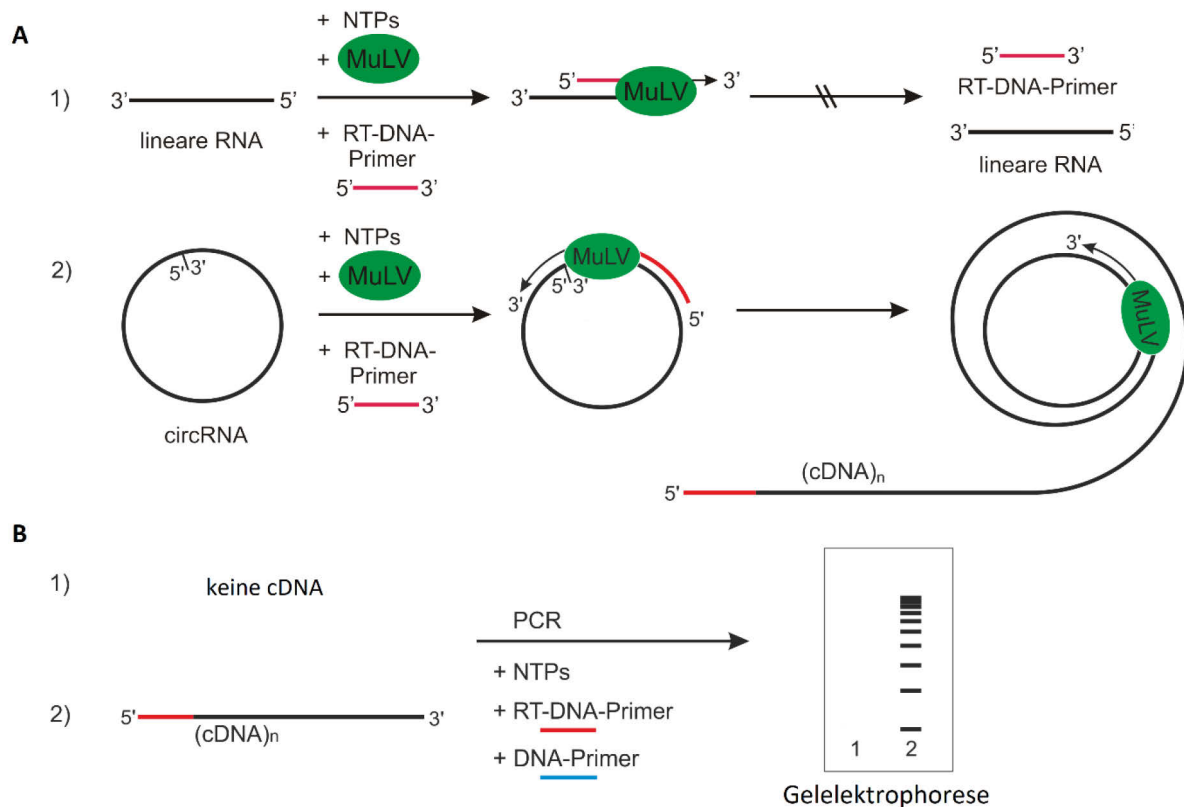
Dabei wurden Mengen von 1 - 20 fmol transkribierter cDNA getestet. Nach Auftragung der ermittelten cT-Werte gegen die Stoffmenge der eingesetzten cDNA war eine lineare Abhängigkeit der Signalstärke von der cDNA-Menge nachweisbar (Abb. 4-23B).

Anhand der hier gezeigten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der entwickelte RC-RT-qPCR-Assay der ersten Generation eine direkte Unterscheidung von zirkulärer und linearer RNA ermöglicht. Nach der RT-qPCR ist jedoch eine Gelelektrophorese notwendig, um den *rolling circle* nachzuweisen. Daher sollte der Assay im nächsten Schritt dahingehend optimiert werden, dass auf eine abschließende Gelelektrophorese verzichtet werden kann.

### **4.1.2. *Rolling circle*-RT-PCR-Methode der zweiten Generation zum spezifischen Nachweis von zirkulärer RNA**

Nachdem gezeigt wurde, dass das *1st generation* Primerset einen signifikanten Unterschied im Bandenmuster für lineare und zirkuläre RNA-Templates generiert, sollte der Assay zu einer Nachweismethode für circRNA weiterentwickelt werden (Abb. 4-24). Dafür war ein neues Primerpaar notwendig, dass ausschließlich die Amplifikation zirkulärer RNA über den *rolling circle*-Mechanismus und qPCR ermöglicht. Im Weiteren wird dieses Primerpaar als *2nd generation* Primerset bezeichnet. Der entscheidende Unterschied zwischen dem *1st* und *2nd generation* Primerset lag in der Anbindung des RT-Primers an die RNA-Templates. So wurde der Primer in der ersten Generation so gewählt, dass eine Anbindung am 3'-Terminus des RNA-Templates erfolgt und in 5'-Richtung transkribiert wird. Das hatte sowohl die Transkription von linearen als auch zirkulären Templates zur Folge. Mit dem *2nd generation* RT-Primer sollte nun die Anbindung an den 5'-Terminus der RNA-Template erfolgen, was eine reverse Transkription in Richtung Ligationstelle ermöglicht. Somit war nur eine Transkription von zirkulärer RNA mit geschlossener Ligationstelle möglich.

Um den weiterentwickelten Assay zu testen, erfolgte zunächst eine direkte Gegenüberstellung des linearen und des zirkulären CRKL-Templates (Abb. 4-25A). Die reverse Transkription, sowie die anschließende qPCR wurden, wie zuvor, unter Standardbedingungen mit jeweils 4 fmol transkribierter cDNA vom linearen und zirkulären CRKL-Template durchgeführt. Dabei trat wie erwartet, nur ein Detektionssignal für den Ansatz mit zirkulärem Ausgangstemplate auf. Unter Verwendung des linearen Templates konnte, wie mit der Kontrolle ohne Template, kein Signal erzeugt werden. In diesem Experiment ergab sich für 4 fmol transkribierte cDNA des circCRKL ein cT-Wert von 16,98. Zuvor konnte mit dem Primerset der ersten Generation nur ein cT-Wert von 16,3 bei 17 fmol eingesetzter cDNA ermittelt werden.

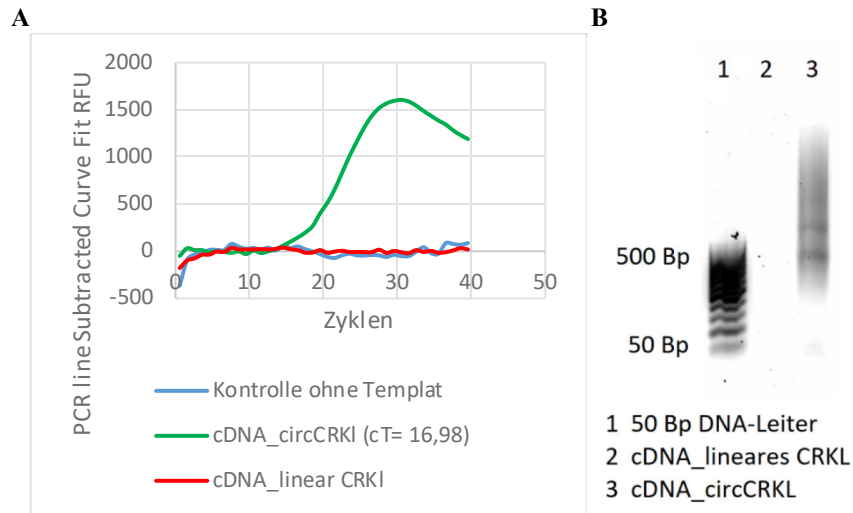


**Abb. 4-24 | Schematische Darstellung des weiterentwickelten RC-RT-PCR-Assays zum spezifischen Nachweis von zirkulärer RNA.** (A) Die reverse Transkription generiert eine multimer cDNA mit zirkulärem RNA-Template und RT-DNA-Primer aus dem 2nd generation Primerset. Das lineare RNA-Template kann nicht zur Bildung einer cDNA verwendet werden, da die reverse Transkription in Richtung der offenen Ligationsstelle verläuft. Die verwendete reverse Transkriptase MuLV ist in Grün dargestellt und der verwendete RT-DNA-Primer in Rot. (B) In der anschließenden PCR mit dem zweiten Primer, kann somit nur die multimer cDNA für eine Amplifikation genutzt werden. Der zweite DNA-Primer aus dem 2nd generation Primerset ist in Blau dargestellt und das zu erwartende Ergebnis einer Gelelektrophorese ist schematisch abgebildet.

Dieser Vergleich zeigte eine deutliche Steigerung der Amplifikationsrate mit dem Assay der zweiten Generation. Dies konnte mit einer besseren Anbindung des RT-Primers an die RNA begründet werden und zeigte den bedeutenden Einfluss der gewählten Primerbinderegion im Transkript. Da die 466 nt große RNA CRKL, eine sehr stabile Sekundärstruktur aufweist, war die Wahl des RT-Primers von entscheidender Bedeutung für die Amplifikationsrate.

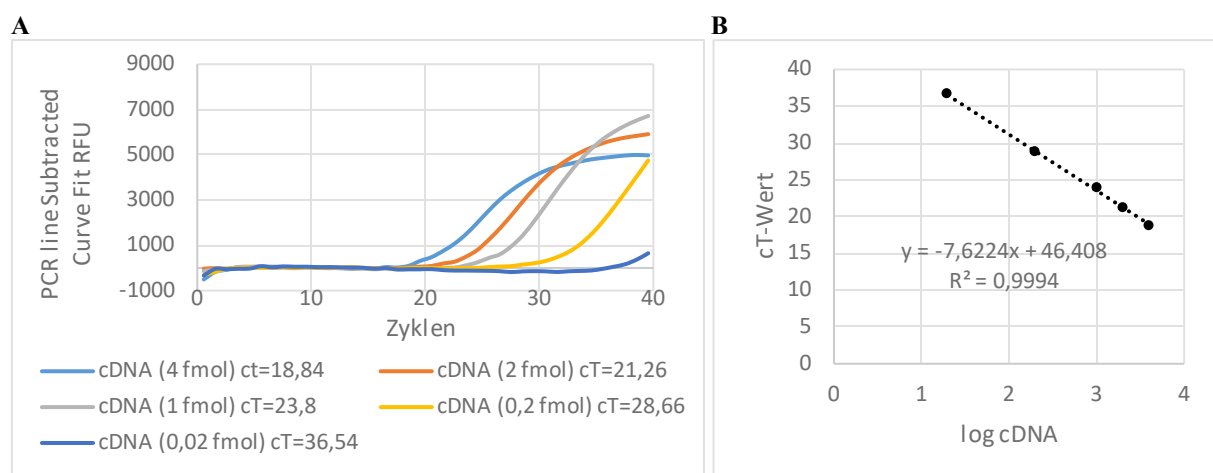
Nach Abschluss der qPCR erfolgte eine Analyse der gebildeten qPCR-Produkte über Agarosegelelektrophorese (Abb. 4-25B). Dabei zeigte sich ausschließlich ein Bandenmuster für die zirkuläre Probe. Wie zu vor trat ein „Schmier“ auf, jedoch in diesem Fall mit zwei Banden, die stärker hervortraten. Ein Vergleich mit der verwendeten DNA-Leiter lässt darauf schließen, dass es sich bei der unteren Bande um das 466 Bp große Monomer handelt. Wohingegen die darüber liegende Bande das Dimer darstellt. Größere PCR-Produkte traten jedoch wieder als

nicht klar separierte Banden auf, was auf die Bildung vieler Nebenprodukte durch die Taq DNA Polymerase zurückzuführen war.



**Abb. 4-25 | Direkter Vergleich von linearen und zirkulären CRKL im RC-RT-qPCR-Assay der zweiten Generation.** (A) Ergebnis der qPCR mit 4 fmol transkribierter cDNA aus der reversen Transkription mit linearen bzw. zirkulären CRKL-Template. (B) Analyse der gebildeten qPCR-Produkte über ein 1 %iges Agarosegel. Nach SYBR Gold-Färbung erfolgte die Bildaufnahme bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535 \text{ nm}$ .

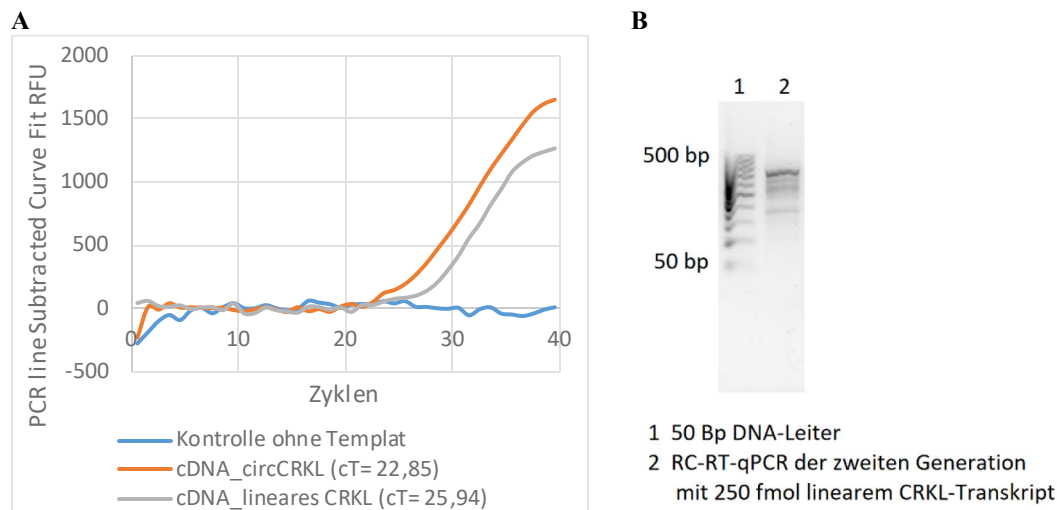
Nachdem gezeigt wurde, dass der weiterentwickelte Assay ausschließlich mit zirkulären Proben arbeitet, sollte eine Messung in Abhängigkeit von der cDNA-Menge durchgeführt werden. Dafür wurde transkribierte cDNA von 0,02 - 4 fmol im RC-RT-qPCR-Assay eingesetzt. Nach Darstellung der qPCR-Signale, erfolgte die Auftragung der ermittelten cT-Werte gegen die jeweils eingesetzte cDNA-Menge (Abb. 4-26).



**Abb. 4-26 | RC-RT-qPCR-Assay der zweiten Generation mit verschiedenen Mengen transkribierter cDNA des circCRKL-Transkripts.** (A) Auswertung der qPCR mit verschiedenen Mengen transkribierter cDNA des circCRKL-Transkripts. (B) Lineare Auftragung der ermittelten cT-Werte gegen die Logarithmen der eingesetzten cDNA-Stoffmengen.

Die Auswertung der qPCR-Signale zeigte eine Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA-Menge. Mit Stoffmengen von 1 - 4 fmol transkribierter cDNA konnten vollständige Amplifikationssignale aufgenommen werden. Die Proben mit 0,2 fmol und 0,02 fmol cDNA zeigten einen Signalanstieg, jedoch kein Plateau. Damit konnte eine Detektionsgrenze für den Assay bei 0,2 - 1 fmol transkribierter cDNA ermittelt werden. Nach Auftragung der ermittelten cT-Werte gegen die eingesetzte logarithmische Stoffmenge, konnte ein linearer Zusammenhang festgestellt werden.

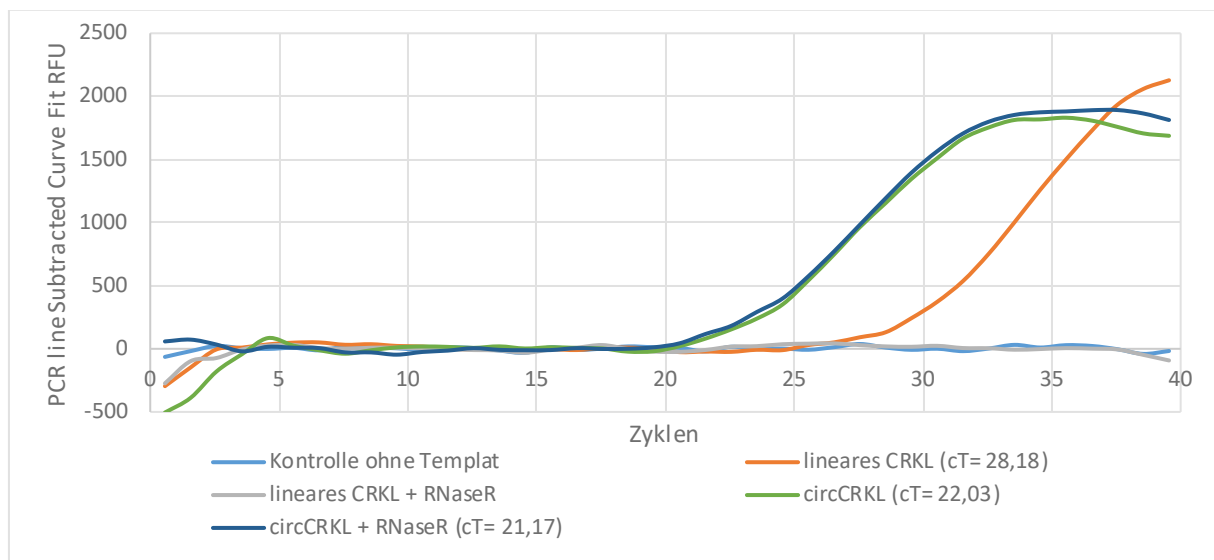
Anschließend bestand die Notwendigkeit, den Assay auf das Vorkommen von falsch-positiven Ergebnissen zu überprüfen. Es bestand die Möglichkeit einer zufälligen Amplifikation mit dem linearen CRKL-Transkript, bei dem die offene Ligationsstelle von der reversen Transkriptase übersprungen wird. Um diesen *over run* zu beobachten wurde der Assay mit 1000fach größerer Menge an linearem CRKL- zu circCRKL-Transkript unter Standardbedingungen durchgeführt. Es erfolgte der Vergleich des RC-RT-qPCR-Assays der zweiten Generation mit 250 amol circCRKL und 250 fmol linearem CRKL als Starttemplate (Abb. 4-27A). Dabei wurde der *over run* des linearen CRKL-Transkript beobachtet. Es konnten cT-Werte von 22,85 mit 250 amol transkribierte cDNA des circCRKL und 25,94 mit 250 fmol des linearen Gegenstücks ermittelt werden. Damit unterschieden sich die beiden Proben um ca. 3 Zyklen, jedoch bei 1000fachen Stoffmengenunterschied.



**Abb. 4-27 | Vergleich des RC-RT-qPCR-Assay der zweiten Generation mit circCRKL bzw. 1000facher Menge lineares CRKL als Starttemplate. (A)** Auswertung der qPCR-Signale des Assays mit 250 amol transkribierte cDNA des circCRKL bzw. 250 fmol des linearen CRKL. **(B)** 1 %iges Agarosegel zur Analyse des im RC-RT-qPCR-Assay amplifizierten Signals mit dem linearen CRKL-Transkript. Detektion nach *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{ex/em} = 470/535$  nm.

Nachdem festzustellen war, dass auch das lineare Transkript bei großen Mengen transkribierter cDNA ein qPCR-Signal erzeugt, wurde eine Gelelektrophorese zur Untersuchung der qPCR-Produkte durchgeführt (Abb. 4-27B). Dabei konnte interessanterweise festgestellt werden, dass ausschließlich PCR-Produkte mit einer Größe <500 Bp mit dem linearen Transkript gebildet wurden. Das größte Produkt, was auch die stärkste Intensität aufwies, lag im Bereich des Monomers. Die kleineren Fragmente stellen, wie zuvor, Abbuchfragmente der PCR dar. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die reverse Transkription des linearen Transkripts einer Wahrscheinlichkeitsverteilung unterliegt. So ist ein einziger *over run* an jeweils mehreren RNA-Molekülen wahrscheinlicher, als mehrere *over runs* an einem einzigen Molekül. Daher traten keine größeren PCR-Produkte auf.

Abschließend sollten Versuche zur Reduzierung des qPCR-Signals für lineare Transkripte vorgenommen werden. Als geeignete Methode hierfür erschien der Verdau der linearen RNA mit RNase R. Da hier mit vollständig gereinigten RNA-Proben gearbeitet wurde, war eine Inhibition der RNase nicht zu erwarten. Die Versuche wurden so konzipiert, dass vor dem standardisierten Assay eine Inkubation der RNA-Templates mit 10 U RNase R für 30 min bei 37°C erfolgte. Zum Vergleich erfolgte der Assay sowohl mit 3 fmol transkribierter cDNA des circCRKL-, sowie 3 pmol cDNA des lineares CRKL-Transkript. Der Verlauf des Assay wurde über qPCR verfolgt (Abb. 4-28).



**Abb. 4-28 | Ergebnis des RC-RT-qPCR-Assays mit linearem und zirkulärem CRKL, sowie mit und ohne RNase R-Inkubation.** Der Assay erfolgte sowohl mit 3 fmol transkribierter cDNA des circCRKL, als auch 3 pmol der linearen RNA mit vorgeschaltetem RNase R-Verdau. Zum Vergleich wurden ebenfalls nicht verdaute Proben analysiert.

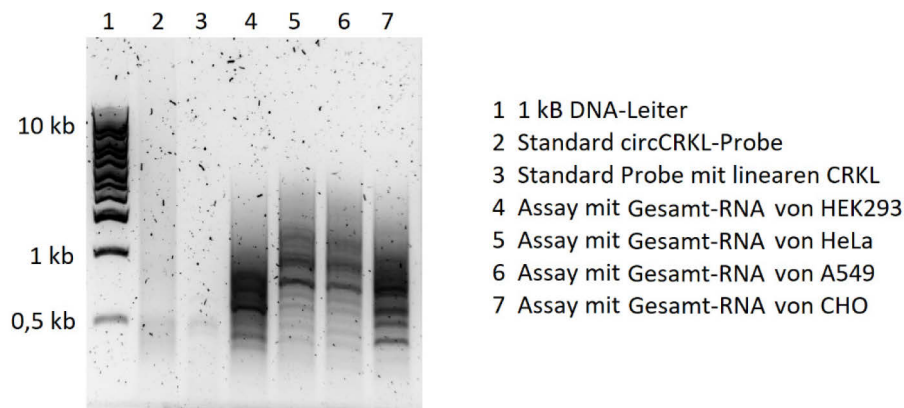
Dabei konnte bei der Probe mit 3 pmol linearen CRKL ohne RNase R-Verdau ein cT-Wert von 28,18 ermittelt werden. Jedoch erfolgte keine Amplifizierung bei der mit RNase R behandelten

Vergleichsprobe. Das zirkuläre CRKL zeigte hingegen, wie erwartet, keinen Unterschied zwischen verdauter und nicht mit RNase R behandelter Probe. Dieses Experiment bestätigte die Einsatzmöglichkeit von RNase R zur Reduktion der *overrun*-Amplifikation von linearer RNA. Auf Versuche zur Bestimmung einer Detektionsgrenze von RNase R behandelter linearer RNA wurde verzichtet, da das Ergebnis leicht durch den RNase R-Verdau beeinflussbar ist. So könnten größere Mengen RNase R oder längere Inkubationszeiten die Nachweisgrenze herabsetzen.

### 4.2.3. Anwendung der *rolling circle*-RT-PCR-Methode der zweiten Generation bei biologischen Proben

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass der RC-RT-qPCR-Assay der zweiten Generation gekoppelt mit RNase R-Verdau gezielt zum Nachweis von circRNA Anwendung finden kann, erfolgten im finalen Schritt Experimente mit der Gesamt-RNA aus verschiedenen Zelllinien. Der Assay wurde mit der Gesamt-RNA aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293), Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa), Zellen des Adenokarzinoms (A549), sowie immortalisierten Zwerghamsterovarien (CHO) durchgeführt. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte aus 1 Million Zellen jeder Zelllinie mittels *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN). Nach Detektion der RNA-Menge, erfolgte die Durchführung des RC-RT-PCR-Assays mit dem *2nd generation* Primerset und 20 ng der jeweiligen Gesamt-RNA. Auf eine qPCR wurde in diesem Fall verzichtet, da in diesem Experiment ausschließlich das finale Bandenmuster von Interesse war. Die 20 ng Gesamt-RNA wurden mit 10 U RNase R verdaut und anschließend für die reverse Transkription und PCR verwendet. Der RNase R erschien zwingend notwendig, da das zirkuläre CRKL aus einer mRNA gebildet wird. Somit war zu erwarten, dass deutlich mehr CRKL in mRNA-Form in der Zelle vorliegt, als das zirkuläre Gegenstück. Nach Abschluss des Assays erfolgte die Analyse über Agarosegelelektrophorese (Abb. 4-29). Zum Vergleich erfolgte zusätzlich die Auftragung der PCR-Produkte des Assays mit der linearen und zirkulären CRKL-Standardprobe. Dabei war festzustellen, dass in allen vier verwendeten Zelllinien PCR-Produkte unterschiedlicher Größe amplifiziert wurden. Im Vergleich mit der linearen CRKL-Standardprobe war festzustellen, dass einige PCR-Produkte auftraten, die kleiner waren als das Monomer. Wie jedoch vorher ersichtlich war, traten auch bei der Standardprobe kleinere Abbruchfragmente auf. Den größten Teil der amplifizierten DNAs stellten jedoch, wie bei der circCRKL-Standardprobe, PCR-Produkte über 500 Bp dar. Bei Betrachtung der Bandenmuster konnte festgestellt werden, dass die Zelllinien HeLa und A549

Hauptbanden im Bereich von 1 Kilobasen aufwiesen, wohingegen HEK293 und CHO's eher kleinere Hauptbanden zeigten.



**Abb. 4-29 | Analyse des RC-RT-qPCR-Assays der zweiten Generation mit Gesamt-RNAs über ein 1 %iges Agarosegel.**

Damit konnte festgehalten werden, dass unterschiedliche Zelllinien auch verschiedene Bandenmuster für das gleiche amplifizierte zirkuläre Transkript aufweisen. Unterschiedliche circCRKL-Konzentrationen können eine mögliche Ursache hierfür sein.

In einem abschließenden Experiment musste überprüft werden, ob die amplifizierten Banden spezifisch für das zirkuläre CRKL waren. Dafür wurde ein weiteres Primerset entworfen, welches auf zwei zufällig gewählten Sequenzen beruhte. Der RC-RT-PCR-Assay wurde mit diesem Primerset und 20 ng Gesamt-RNA der HEK293-Zelllinie durchgeführt und über ein Agarosegel analysiert. Daraus war ersichtlich, dass es mit dem *random* Primerset zu keinerlei Amplifikation von PCR-Produkt kam, was schlussfolgernd einen spezifischen Nachweis von circCRKL durch den RC-RT-PCR-Assay der zweiten Generation bedeutet.

Der Nachweis von zirkulärem CRKL in menschlichen Zelllinien wie HEK293, HeLa und A549 wurde erwartet, da CRKL im menschlichen pre-mRNA-Transkript enthalten ist [Kim YH *et al.* 2010]. Interessant war jedoch der Nachweis der circRNA in der Hamsterzelllinie CHO. Allerdings war bekannt, dass das circCRKL-Transkript kein ausschließlich menschliches Transkript darstellt, da es bereits in den Mauszellen C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> nachgewiesen werden konnte [Legnini *et al.* 2017].

Mit Etablierung des RC-RT-PCR-Assays der zweiten Generation konnte ein Weg zur spezifischen Detektion von zirkulärer RNA in biologischen Proben bereitet werden. Der besonders hervorzuhebende Vorteil dieser Methode gegenüber herkömmlichen Nachweisverfahren für zirkuläre RNA, war der Verzicht auf Sequenzierungen oder der Annahme eines vollständigen RNase R-Verdaus. Da der RC-RT-PCR-Assay mit jedem herkömmlichen PCR-



Thermocycler mit anschließender Gelelektrophorese durchzuführen ist, kann auch ein nicht vollständig biologisch eingerichtetes Labor diesen durchführen. Jedoch bietet der Einsatz eines *real time* PCR-Geräts die Möglichkeit, den Assay zum *high-throughput screening* von biologischen Proben zu verwenden. So wäre die Untersuchung von 127 Proben mit einer Kontrolle in einem Durchlauf mit einer 384 *well plate* möglich. Eine anschließende Gelelektrophorese kann genutzt werden, um die amplifizierten PCR-Produkte auf das zu erwartende Bandenmuster zu überprüfen und so das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen auszuschließen.

#### **4.2.4. Zusammenfassung der Etablierung einer *rolling circle*-basierten Methode zum spezifischen Nachweis von zirkulärer RNA**

Im zweiten Thema dieser Arbeit sollte ein Assay zum Nachweis von zirkulärer RNA etabliert werden. Dabei konnte zunächst eine Methode entwickelt werden, die eine Unterscheidung von linearen und zirkulären RNA-Transkripten ermöglicht. Das dafür entworfene Assay der ersten Generation konnte erfolgreich genutzt werden, um eine multimeren cDNA über reverse Transkription mit *rolling circle* Mechanismus aus einem zirkulären RNA-Transkript zu generieren. Mit dem linearen Gegenstück wurde hingegen nur eine monomere cDNA gebildet. Eine anschließende PCR wurde genutzt, um die gebildete cDNA zu amplifizieren. Dabei konnten mit der multimeren cDNA der zirkulären RNA-Probe eine Reihe von PCR-Produkten unterschiedlicher Länge gebildet werden. Die monomere cDNA der linearen Probe, ermöglichte ausschließlich die Amplifikation des Monomers. Damit konnte bei direkter Gegenüberstellung beider Proben in einer Gelelektrophorese, ein spezifisches Signal für zirkuläre RNA abgelesen werden. Anschließend wurde der Assay erfolgreich auf qPCR-Ebene übertragen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass der *rolling circle* Mechanismus zur Unterscheidung von linearer und zirkulärer RNA genutzt werden kann, sollte die Weiterentwicklung zu einer Nachweismethode für circRNA erfolgen. Das dafür entworfene Primersset der zweiten Generation sollte ausschließlich das Umschreiben von zirkulärer RNA in eine multimeren cDNA ermöglichen, indem die reverse Transkription in Richtung Ligationsstelle des RNA-Transkripts abläuft. Dies sollte wiederum die Bildung von cDNA aus linearen Proben verhindern. Eine anschließende qPCR ermöglicht so ausschließlich den Nachweis der zirkulären RNA. In einer direkten Gegenüberstellung von linearer und zirkulärer RNA-Probe konnte dieses Prinzip bestätigt werden. Jedoch musste festgestellt werden, dass bei 1000fachen Überschuss der linearen Probe, auch eine cDNA-Bildung aus der linearen RNA mit

anschließender Amplifikation erfolgte. Nach Gelanalyse zeigte sich jedoch, dass die gebildete cDNA nur eine Größe im Bereich des Monomers aufwies und damit einen signifikanten Unterschied zu den multimeren PCR-Produkten der zirkulären Probe aufzeigte. Anschließend konnte durch Vorschalten eines RNase R-Verdau, das Signal für 1000fach lineares RNA-Transkript vollständig unterdrückt werden. Im finalen Experiment wurde gezeigt, dass dieser Assay auch mit biologischen Proben durchgeführt werden kann. So konnte zirkuläres CRKL in RNA aus den menschlichen Zelllinien HEK293, HeLa und A549, sowie in der Hamsterzelllinie CHO nachgewiesen werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Zirkuläre RNAs gehören zur Gruppe der langen, nicht-codierenden RNA's und weisen, wie mikroRNA's, genregulatorische Funktionen auf [Memczak *et al.* 2013]. Im Vergleich zu miRNAs steht jedoch die Erforschung der circRNAs noch in ihren Anfängen und schreitet nur langsam voran [Jeck, Sharpless 2014]. Der Grund dafür liegt in den fehlenden analytischen Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung. Daher stellt die Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden eine Schlüsselrolle in der circRNA-Forschung dar.

An dieser Stelle schließt diese Arbeit mit der Etablierung neuer Methoden zur Funktionalisierung von zirkulärer RNA an, da sie für deren Untersuchung essentiell sind. Für die Markierung von RNA haben sich bereits einige Methoden etabliert. Eine besondere Herausforderung stellt jedoch nach wie vor die interne Modifizierung von RNA da, die aber für eine Funktionalisierung von zirkulärer RNA unerlässlich ist.

Für die Entwicklung einer universell einsetzbaren Methode zur Synthese funktionalisierter RNA wurden anfänglich ausschließlich enzymatische Reaktionen verwendet. Dabei konnte zunächst erfolgreich eine nicht-modifizierte RNA aus einem 5'-Monophosphat-Transkript mit einer 70 %igen Ausbeute mittels T4 RNA Ligase 2 generiert werden. Anschließend erfolgte die Erweiterung des Protokolls um einen Ligationsschritt zum Einbau eines modifizierten Bausteins am 3'-Terminus des linearen Transkripts. Dabei konnte der erfolgreiche Einbau des pUp<sup>FAM</sup> und des pUp<sup>Prg</sup> verzeichnet werden. Bei der anschließenden Zyklisierung zeigte sich jedoch, dass ausschließlich das pUp<sup>Prg</sup> von der T4 RNA Ligase 2 akzeptiert wurde. Das aber nur in Kombination mit einer deutlichen verringerten Ausbeute aufgrund von Enzyminhibition und umfangreichen Aufreinigungsschritten. Daher erfolgte eine Abwandlung des Protokolls, um eine Ligation mittels RtcB-Ligase vorzunehmen. Jedoch war hierbei festzustellen, dass die RtcB-Ligase vollständig vom modifizierten Baustein inhibiert wurde und damit nicht zur Herstellung einer funktionalisierten circRNA geeignet ist.

Da über enzymatische Ligation nur geringe Ausbeuten an modifizierter RNA hergestellt werden konnten, wurde ein Protokoll zur Herstellung von circRNA mittels chemischer Ligation entwickelt. Dabei konnte zunächst erfolgreich eine 5'-azidmodifizierte RNA durch *in vitro* Transkription mit einem modifizierten Startnukleotid hergestellt werden. Sowohl der modifizierte Baustein 5'-Azido-G, als auch das 5'-Azido-TrG fungierten hier als Startnukleotide. Anschließend erfolgte die Modifizierung am 3'-Terminus mit pUp(NH<sub>2</sub>/Prg) über RNA Ligase 1. Daraufhin erfolgte die Zyklisierung über CuAAC. Anschließend konnte

für das 5'-Azido-G-modifizierte Transkript eine Zyklisierungsausbeute von 7 % und für das 5'-Azido-TrG-Transkript 11 % ermittelt werden, jedoch nur in Kombination mit einem teilweisen Abbau der RNA durch das Kupfer (I).

Anhand dieser Ergebnisse war festzustellen, dass eine Zyklisierung von modifizierter RNA sowohl über enzymatische, als auch chemische Ligation möglich ist. Dennoch eigneten sich die hier durchgeführten Protokolle nicht für eine quantitative Herstellung. Zum einen aufgrund von schlechten Zyklisierungsausbeuten und zum anderen aufgrund von zirkulären nicht abtrennbaren Nebenprodukten bei den Zyklisierungen mit T4 RNA Ligasen. Dieses Protokoll stellt allerdings eine sinnvolle Vorgehensweise dar, wenn ein nahezu vollständiger Einbau eines modifizierten Bausteins am 3'-Terminus erzielt werden kann. Das ist jedoch stark Template- und bausteinabhängig, was die enzymatische Zyklisierung als universell einsetzbare Methode in Frage stellt.

Die chemische Ligation von modifizierter RNA mittels CuAAC erschien hierbei als vielversprechendste Vorgehensweise. Zum einen kommt es nicht zur Bildung unmodifizierter zirkulärer Nebenprodukte und zum anderen konnte unter nicht optimalen Reaktionsbedingungen, das circCRKL mit einer Ausbeute von 11 % generiert werden. Um dieses chemo-enzymatische Protokoll weiterzuentwickeln, müsste das zu verwendende CRKL-Transkript mit einer Ligationsstelle in einem doppelsträngigen linearen Bereich neu designt werden. Dies würde zu einer optimalen Positionierung der modifizierten Termini für eine CuAAC-vermittelte Zyklisierung führen. Hierbei könnte es jedoch zu Komplikationen bei der 3'-Modifizierung mit der T4 RNA Ligase 1 kommen, da dieses Enzym nur einzelsträngige RNA-Bereiche ligiert. Neben der 3'-Modifizierung wäre eine Optimierung der *in vitro* Transkription mit modifizierten Starterbaustein durchzuführen. Der Einsatz der T7-RNA-Polymerase zeigte einen guten Einbau der Starterbaustein Azido-G und Azido-TrG am 5'-Terminus, aber verbunden mit einer starken Inhibition des Enzyms, was die Menge an Gesamt-RNA signifikant reduziert. Andere RNA-Polymerasen, wie T3 oder SP6 könnten hier eine vielversprechende Alternative sein. So konnte bereits erfolgreich mit diesen Polymerasen ein Dinukleotid als modifizierter Starter in RNA eingebaut werden [Samanta *et al.* 2013]. Mit einer geringen Inhibition der *in vitro* Transkription und einer optimierten chemischen Zyklisierung wäre der Weg zur quantitativen Herstellung von modifizierter circRNA bereitet und damit verbunden zu biologischen Untersuchungen auf zellulärer Ebene.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein Assay zum spezifischen Nachweis von zirkulärer RNA entwickelt. Dabei konnte im ersten Schritt eine Methode zur Differenzierung von linearer und zirkulärer RNA mit dem Primerpaar der ersten Generation etabliert werden. Der dafür

entworfenen Assay wurde erfolgreich genutzt, um eine multimeren cDNA über einen *rolling circle*-Mechanismus aus einem zirkulären RNA-Transkript zu generieren. Nach Amplifizierung der cDNA mittels qPCR und anschließender Gelanalyse, konnte ein spezifisches Bandenmuster für die circRNA nachgewiesen werden, was eine direkte Unterscheidung zur linearen RNA möglich macht. Daraufhin erfolgte die Weiterentwicklung des Assays zu einer Nachweismethode für zirkuläre RNA. Dafür wurde das Primerpaar der zweiten Generation entwickelt, das ausschließlich eine Amplifizierung der circRNA über den *rolling circle* Mechanismus zulässt. Ab einem 1000fachen Überschuss linearer RNA zeigte sich aber auch hier ein qPCR-Signal, welches allerdings nach Gelanalyse eindeutig als Signal der linearen RNA identifiziert werden konnte. Dies zeigt, dass eine Gelanalyse zur Identifizierung von falsch-positiven Ergebnissen verwendet werden kann, was dieses Assay einzigartig macht. Ein RNase R-Verdau vor der reversen Transkription und somit vor dem eigentlichen Beginn des Assays verhinderte schließlich die Entstehung eines Signals für lineare RNA. Abschließend konnte mit dieser Methode erfolgreich circRNA aus der Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien nachgewiesen werden, was den künftigen Anwendungsbereich dieser Nachweismethode aufzeigt. So ist es möglich diesen Assay für verschiedenste zirkuläre Transkripte zu etablieren und diese durch Screenings in biologischen Proben nachzuweisen.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Für Arbeiten mit RNA wurden, sofern verfügbar, Pyrogen-, DNase- und RNase-frei zertifizierte Chemikalien und Reagenzien verwendet. Wässrige Lösungen und Puffer wurden mit gefiltertem, deionisiertem Reinstwasser hergestellt und mittels 0,45 µm Nalgene® Rapid-Flow™ Bottle Top Filters (PES-Membran, steril, *Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) bzw. 0,2 µm Spritzenfilter (steril, *Carl Roth*, Karlsruhe) gefiltert. Reinstwasser wurde mithilfe der Wasseraufbereitungsanlage Astacus Life Science von *membraPure* (Henningsdorf) gewonnen. Für kleine Volumina wurde *nuclease-free water* der Firma *New England Biolabs* (Ipswich, MA, USA) verwendet.

Verwendete Chemikalien wurden von den Firmen *Carl Roth* (Karlsruhe), *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen) bzw. *Acros* (Geel, Belgien) bezogen. Die Plastikverbrauchsmittel wurden bei *Carl Roth* (Karlsruhe), *Starlab* (Hamburg), *Sarstedt* (Nümbrecht) und *Biozym* (Hessisch Oldendorf) erworben, PCR-8er-Streifen (semi-skirted) bei *Peqlab* (Erlangen), *Amicon®* Ultra-0,5 ml Zentrifugenfilter (3K und 10K) bei *Merck Millipore* (Billerica, MA, USA) und SYBR® Gold *nucleic acid gel stain* bei *Invitrogen* (Carlsbad, MA USA).

### 6.2 Lösungen und Puffer

Denaturierender Ladepuffer	98 % (v/v) Formamid; 2 % (v/v) 0,5 M EDTA
Denaturierende PAA-Lösung	20 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1); 0,5x TBE; 8 M Harnstoff
Elutionspuffer	0,3 M NaOAc; pH 5,2
Harnstofflösung	8 M Harnstoff in 0,5x TBE
Imidazo/HCl	1M, pH 7
Ladepuffer (denaturierend)	98 % (v/v) Formamid; 2 % (v/v) 0,5 M EDTA
MES-Puffer	50 mM 2- <i>N</i> -Morpholinoethansulfonat; 20 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 6 eingestellt mit NaOH
Nativer Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerol in 1x TBE

## Experimenteller Teil

Native PAA-Lösung	20 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1); 0,5x TBE
Natriumacetat-Puffer	3 M NaOAc; pH 5,2
PUS-Puffer (1x)	0,1 M Tris-HCl pH 8,0 (25 °C); 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 M NH <sub>4</sub> OAc
Roti®-PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1); äquilibriert in TE-Buffer; pH 8,3
TBE (0,5x)	45 mM Tris-Borat; 1 mM EDTA; pH 8,3

Zusätzlich wurden kommerziell erwerbliche Enzympuffer verwendet:

<i>NEBuffer 3</i> (1x)	100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT; pH 7,9 (25°C)
<i>T4 PNK Reaction Buffer</i> (1x)	70 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM DTT; pH 7,6 (25°C)
<i>T4 RNA Ligase Reaction Buffer</i> (1x)	50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT; pH 7,5 (25°C)
<i>T4 RNA Ligase 2 Reaction Buffer</i> (1x)	50 mM Tris-HCl; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT; 0,4 mM ATP; pH 7,5 (25°C)
<i>ThermoPol®Reaction Buffer</i> (1x)	20 mM Tris-HCl; 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 10 mM KCl; 2 mM MgSO <sub>4</sub> ; 0,1 % Triton® X-100; pH 8,8 (25°C)

### 6.3 Enzyme, Kits und DNA/RNA-Marker

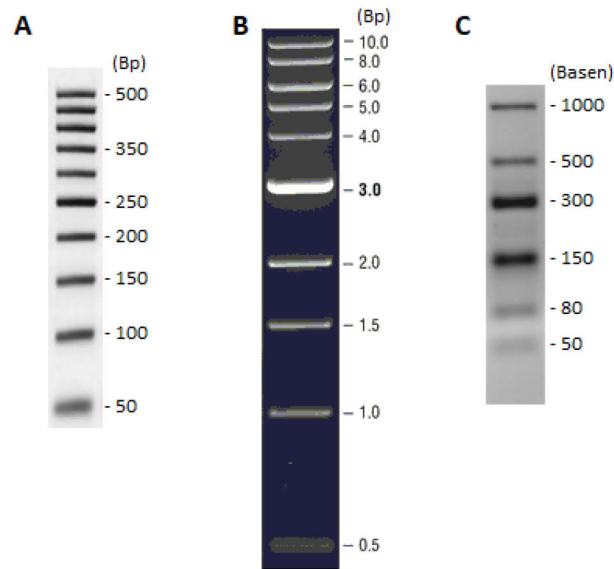
50 bp DNA-Ladder (#2801.1)	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP; #M0290)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
Deoxynucleotide Solution Mix dNTPs (#N0447)	<i>New England Biolabs</i> , Ipswich, MA, USA
DNase I, RNase-free (#EN0521)	<i>ThermoFisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA

## Experimenteller Teil

DNase I, RNase-free (#M0303)	<i>New England Biolabs, Ipswich, MA, USA</i>
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#4368814)	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</i>
HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (E2040S)	<i>New England Biolabs, Ipswich, MA, USA</i>
Low Range ssRNA Ladder (0,05-1 kb; #N0364)	<i>New England Biolabs, Ipswich, MA, USA</i>
NTP Set (#R0481)	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</i>
RiboLock™ RNase Inhibitor (#EO0381)	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</i>
Ribonuclease R, E. coli (#RNR07250)	<i>Epicentre, Madison, WI, USA</i>
RNeasy Mini Kit (#74104)	<i>QIAGEN, Manchester, UK</i>
T4 Polynucleotide Kinase (#M0201)	<i>New England Biolabs, Ipswich, MA, USA</i>
T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase; #M0204)	<i>New England Biolabs, Ipswich, MA, USA</i>
T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase; #M0239)	<i>New England Biolabs, Ipswich, MA, USA</i>
Taq PCR Kit (E5000S)	<i>New England Biolabs, Ipswich, MA, USA</i>
TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (#K0441)	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA</i>



## Experimenteller Teil



- A 50 bp DNA-Ladder (#2801.1, *Carl Roth*)
- B 1 kb DNA-Ladder (#N3232S, *New England Biolabs*)
- C Low Range ssRNA ladder (ssRNA Leiter) (#N0364, *New England Biolabs*)

## 6.4 Template, Oligonukleotide, RNA-Bausteine

### RNA-Sequenzen

Name	Sequenz 5' → 3'	Nukleotide
69mer	GGG AGA ACU UUC GCA AAU GGA CUC UGG AAG AUC GGC GCG CAC GAA UCG GCG AUA GCG CGC UGA UCA AAA	69
CRKL	GACUGCCUUGGCAUUAGAGGUAUCCAAGCCCACCA AUGGGAUCUGUCUCAGCACCCAACCUGCCUACAGC AGAAGAUAAACCUGGAAUAUGUACGGACUCUGUAUG AUUUUCCUGGGAAUGAUGCCGAAGACCUGCCCUUU AAAAAGGGUGAGAUCUAGUGAUAAUAGAGAAGCC UGAAGAACAGUGGUGGAGUGCCCGGAACAAGGAUG GCCGGGUUGGGAUGAUUCCUGUCCCUUAUGUCGAA AAGCUUGUGAGAUCUACACACGGAAGCAUGG AAAUAGGAAUCCAACAGUUAUGGGAUCCCAGAAC CUGCUC AUGCAUACGCUCAACCUCAGACCACAACU CCUCUACCUGCAGUUUCCGGUUCUCCUGGGGCAGC AAUCACCCCUUGCCAUCCACACAGAAUGGACCUG UCUUUGCGAAAGCAAUCCAGAAAAGAGUACCCUGU GCUUAUGACAA	466
pre-let7g	AGG UAG UAG UUU GUA CAG UUU GAG GGU CUA UGA UAC CAC CCG GUA CAG GAG AUA ACU GUA CAG GCC ACU GCC UUG C	76

## Experimenteller Teil

Name	Sequenz 5' → 3'	Nukleotide
PVT1	GAAGGAGAUUAAAAAGAUGCCCCUCAAGAUGGCUG UGCCUGUCAGCUGCAUGGAGCUUCGUUCAAGUAUU UUCUGAGCCUGAUGGAUUUACAGUGAUCUUCAGUG GUCUGGGGAAUAACGCUGGUGGAACCAUGCACUGG AAUGACACACGCCCCGGCACAUUUCAGGAUACUAAA AGUGGUUUUAAGGGAGGCUGUGGCUGAAUGCCUCA UGGAUUCUUACAGCUUGGAUGUCCAUGGGGGACGA AGGACUGCAGCUGGCUGAGAGGGUUGAGAUCUCUG UUUACUUAGAUCUCUGCCAACUCCUUUGGGUCUC CCUAUGGAAUGUAAGACCCCGACUCUCCUGGUGA AGCAUCUGAUGCACGUUCCAUCCGGCGCUCAGCUG GGCUUGAGGCCUGAUCUUUUGGCCA	410

### DNA-Template und Primer

Die DNA-Template wurden von *Biomers* (Ulm) und *Biotez* (Berlin) erworben. Die Plasmide TOPO6.9 mit der CRKL- und der PVT1-Sequenz wurden von Nikolaus Rajewsky zur Verfügung gestellt.

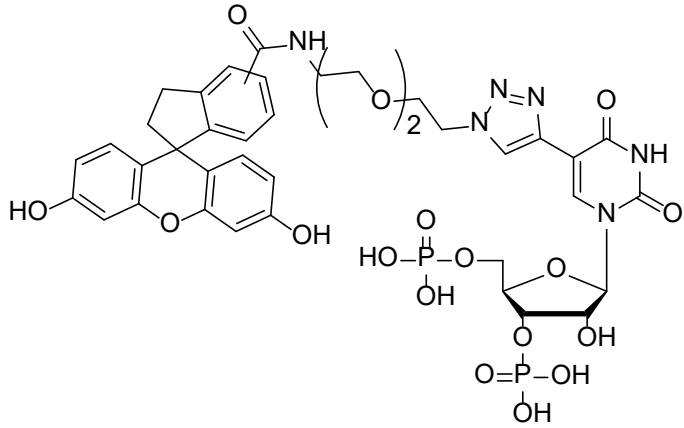
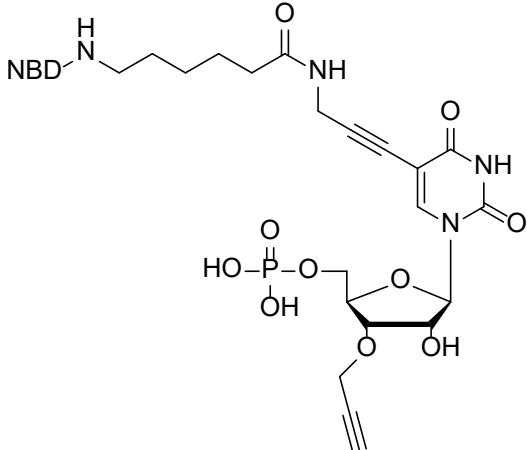
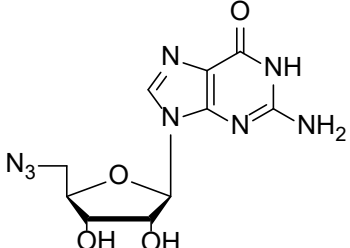
Name	Sequenz 5' → 3'	Nukleotide
69mer DNA- Template 3	TTT TGA TCA GCG CGC TAT CGC CGA TTC GTG CGC GCC GAT CTT CCA GAG TCC ATT TGC GAA AGT TCT CCC TAT AGT GAG TCG TAT TA	80
PCR-Primer 69mer 2	TGC GAA AGT TCT CCC	15
RT/PCR-Primer 69mer 1	TTT TGA TCA GCG CGC	15
mod. DNA Splint CRKL	CAA GGC AGT CAT TGT CAT AAG	21
compl. DNA Splint CRKL	CAA GGC AGT CTT GTC ATA AG	20
N3TrG-CRKL- pU DNA-Splint kurz	CAG TCA ATT GTC	12

# Experimenteller Teil

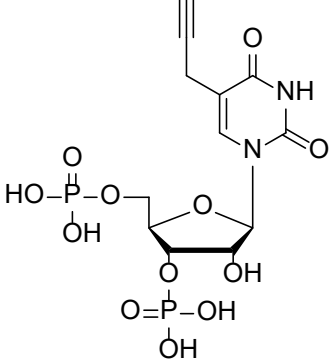
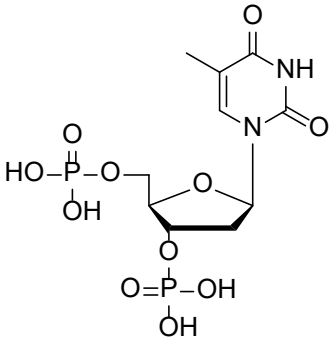
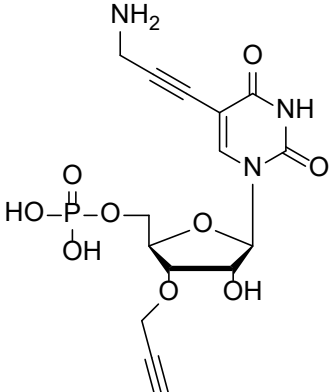
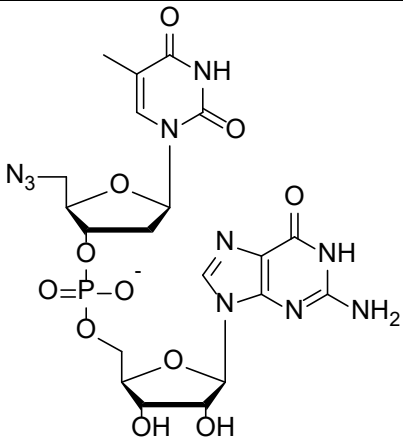
Name	Sequenz 5' → 3'	Nukleotide
N3TrG-CRKL- pU DNA-Splint lang	ATA CCT CTA ATG CCA AGG CAG TCA ATT GTC ATA AGC ACA GGG TAC	45
Primer CRKL fw	GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGA CTG CCT TGG CAT TAG AGG TAT CCA AGC CCA CCA ATG	60
Primer CRKL rv	TTG TCA TAA GCA CAG GGT ACT CT	23
RC-RT-CRKL Pr.1	TTGTCATAAGCA	12
RC-CRKL Pr.1	GACTGCCTTGGC	12
RC-RT-CRKL Pr.2	GCCAAGGCAGTC	12
RC-CRKL Pr.2	ATTAGAGGTATC	12
Primer PVT1 fw	GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGA AGG AGA TTA AAA AGA TGC CC	47
Primer PVT1 rv	TGG CCA AAA GAT CAG GCC TCA AGC CCA GCT GAG CG	35
Random Primer 1	AGTTCTCCCTGATCAGCGCGCT	22
Random Primer 2	GCGAAAGTTAGCGCGCTATCGC	22
T7 Promotor	GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG	20

## Nukleotidbausteine

Die Synthesen der verwendeten Nukleotidbausteine wurden durch Dr. C. M. Dojahn (pUp<sup>FAM</sup>), Dr. A. Klose-Stier (N<sub>3</sub>-G) und Dipl.-Chem. C. Kimmich (pU(NBD/Prg), pUp<sup>Prg</sup>, pTp, pU (NH<sub>2</sub>/Prg).

Struktur	Name	Abkürzung
	FAM-markiertes 3',5'-O,O'- Bisphosphatidyl- uridin	pUp <sup>FAM</sup>
	NBD-markiertes 5'-O-Phosphat- 3'-O- Propargyluridin	pU(NBD/Prg)
	5'-Azido-5'- Deoxyguanosin	N <sub>3</sub> -G/ Azido-G

# Experimenteller Teil

	<p>3',5'-<i>O,O</i>- Bisphosphat-5- propargyluridin</p>	<p>pUp<sup>Prg</sup></p>
	<p>3',5'-<i>O,O</i>- Bisphosphat- Desoxythymidin</p>	<p>pTp</p>
	<p>5'-<i>O</i>-Phosphat- 3'-<i>O</i>-Propargyl-5- Aminoethyluridin</p>	<p>pU(NH<sub>2</sub>/Prg)</p>
	<p>5'-Azido- Thymidin-3'-<i>O</i>- Guanosinmonophosphat</p>	<p>N<sub>3</sub>-TrG</p>

## 6.5 Messgeräte

Gelelektrophorese	Mini-Protean® Tetra System ( <i>Biorad</i> ) Power Supply PowerPac Basic ( <i>BioRad</i> )
Heizblock	HLC Cooling-ThermoMixer MKR13 ( <i>Ditabis</i> ) HX Mini Blockheizer ( <i>peqLab</i> ) Metal Block Thermostat MBT 250 ( <i>ETG</i> )
PCR-Gerät	Tgradient 96 ( <i>Biometra</i> )
Photosystem	ChemiDoc™ MP Imaging System ( <i>BioRad</i> ) Image Station 4000MM Pro ( <i>Kodak</i> )
real time PCR-Gerät	iQ™ 5 Multicolor Real-time PCR Detection System ( <i>BioRad</i> )
Schüttelinkubator	Reax Control ( <i>Heidolph</i> )
UV/VIS-Spektroskopie	NanoDrop ND-1000 ( <i>NanoDrop Technologies</i> )
Waage	ALC-110.4 ( <i>Acculab</i> )
Zentrifuge	Herapheus Fresco17 ( <i>Thermo</i> ) Mini-Zentrifuge Spectrafuge ( <i>neoLab</i> )

## 6.6 Molekularbiologische Methoden

### DNA-/RNA-Präzipitation

Die zu fällende Oligonukleotidlösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,6 versetzt. Danach wurde für die DNA-Fällung 2,5 Volumen Ethanol zugegeben bzw. für die RNA-Fällung 3 Volumen Ethanol und die Oligonukleotide für mindestens 5 h bei -20 °C gefällt. Bei kürzeren Oligonukleotiden (< 100 nt) bzw. geringen Konzentrationen erfolgte die Fällung über Nacht. Im Anschluss wurde die gefällte Lösung für 30 min bei 13300 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand entnommen und das Pellet in dH<sub>2</sub>O gelöst.

### PCI-Extraktion

Die Oligonukleotidlösung wurde mit PCI-Lösung (1:1, v/v) versetzt und vermischt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt zur Phasentrennung für 2 min bei 13300 rpm.

Die wässrige Phase wurde abgetrennt, erneut mit PCI-Lösung versetzt und die Prozedur wiederholt. Danach wurden die wässrigen Phasen vereint und mit Ethanol gefällt.

### **Konzentrationsbestimmung**

Der Oligonukleotidgehalt in Lösungen wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 bestimmt. Dazu wurde 1 µl der Probe aufgetragen und die Absorption bei 260 nm gemessen. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung über das Lambert-Beer'sche Gesetz. Die dafür benötigten Extinktionskoeffizienten wurden mit dem Programm *Oligo Analyzer 3.1* (IDT) ermittelt.

### ***in vitro* Transkription**

Die *in vitro* Transkription wurde entweder mit dem *TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit* oder dem *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit* durchgeführt. Dafür wurden die Protokolle nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden jedoch zusätzlich 10 mM MgCl<sub>2</sub> zum Reaktionsansatz gegeben, da dies einen positiven Effekt auf die Transkription hat. Vor Transkriptionsbeginn wurden die DNA-Primer für 3 min bei 90 °C denaturiert, 5 min bei Raumtemperatur renaturiert und anschließend 5 min auf Eis gelagert. Nach Abschluss der Transkription wurden die DNA-Primer mit 0,1 U/µl DNase I verdaut und die RNA mit Ethanol bei -20 °C gefällt. Bei anschließender Gelaufreinigung wurde die RNA vorher mit Amicon 3K/10K Zentrifugenfiltern entsalzt.

### ***in vitro* Transkription mit Azido-G (run-off-Methode)**

Die Transkription wurde mit dem *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit* durchgeführt. Für die Reaktion mit modifiziertem Starter wurde ein eigenes Protokoll entwickelt. Es wurden 50 µl Ansätze mit folgenden finalen Konzentrationen verwendet: 0,75 mM N<sub>3</sub>G, 2,5 mM GTP, 10 mM ATP/UTP/CTP, 1x T7 Reaktionspuffer, 1 µM Primer/~ 1 µg Plasmid, 1x T7 RNA Polymerase Mix (wie vom Hersteller angegeben). Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 2,5 h. Anschließend wurden die DNA-Primer mit 5 U DNase I bei 37 °C für 30 min verdaut. Danach wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt und mittels Amiconfilter entsalzt.

### ***in vitro* Transkription mit Azido-TrG (run-off-Methode)**

Die Transkription wurde ebenfalls mit dem *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit* durchgeführt. Es wurden 20 µl Ansätze mit folgenden Konzentrationen verwendet: 1 mM N<sub>3</sub>-TrG, 1 mM GTP, 2 mM ATP/UTP/CTP, 1x T7 Reaktionspuffer, ~1 µg Plasmid, 1x Enzym-Mix. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 2,5 h. Nach Reaktionsende wurden 2 µl DNase I hinzugegeben und der Ansatz für weitere 30 min bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt und mittels Amiconfiltration entsalzt.

### ***in vitro* Transkription mit Azido-G (fed-batch-mod-Methode)**

Wie zuvor erfolgte die Transkription mit dem *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit*. Die Reaktion wurde im 20 µl-Maßstab mit folgenden Mengen gestartet: 0,75 mM N<sub>3</sub>-G, 2,5 mM GTP, 10 mM ATP/CTP/UTP, 1x T7 Reaktionspuffer, ~1 µg Plasmid, 1x Enzym-Mix. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 2,5 h durchgeführt. Jedoch erfolgte alle 15 min die Zugabe von weiteren N<sub>3</sub>-G, bis nach 2 h durch 8 Zugaben eine finale N<sub>3</sub>-G-Konzentration von 2,75 mM erreicht wurde. Die Reaktion wurde weitere 30 min inkubiert, bis die 2,5 h Reaktionszeit erreicht wurden. Dann erfolgte die Zugabe von 2 µl DNase I und das Reaktionsgemisch wurde weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ethanolfällung der RNA mit anschließender Entsalzung über Amiconfiltration.

### **CIP-Dephosphorylierung**

Die Alkaline Phosphatase CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, NEB) wurde für die Dephosphorylierung von RNA verwendet. Dafür wurden folgende Mengen in einem Volumen von 200 µl angesetzt: ~1 nmol RNA, 1x *NEBuffer 3* (NEB), 0,3 U/µl Ribolock® RNase Inhibitor, 0,1 U/µl CIP. Die Reaktion verlief über 1 h bei 37 °C. Die Aufarbeitung erfolgte mittels Ethanolfällung, PCI und Amiconfiltration. Für die nachfolgende Phosphorylierungsreaktion war eine Gelaufreinigung der RNA notwendig, um die Phosphatase CIP vollständig entfernen zu können.



### **PNK Phosphorylierung**

Für die Phosphorylierung von RNA wurde die T4-Polynukleotidkinase PNK (NEB) verwendet. Folgende finale Mengen wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl verwendet: 0,5 nmol RNA, 1x T4 PNK Reaktionspuffer (NEB), 1mM ATP, 0,4 U/µl Ribolock RNase-Inhibitor, 0,4 U/µl PNK. Die Reaktion wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Amiconfiltration entsalzt. Für nachfolgende Ligationsexperimente war keine weitere Aufarbeitung notwendig.

### **3'-Modifizierung mittels T4 RNA Ligase 1 (NEB)**

Die Modifizierung des 3'-Endes wurde mit der T4 RNA Ligase 1 in 150 µl-Ansätzen durchgeführt. Folgende Mengen wurden verwendet: ~ 500 pmol RNA, 1x T4 RNA Ligase 1 Puffer, 0,65 mM 5'-monophosphorylierter Nukleotidbaustein, 1 mM ATP, 0,7 U/µl Ribolock® RNase Inhibitor, 0,7 U/µl T4 RNA Ligase 1, 20 % DMSO. Um optimale Voraussetzungen zu gewährleisten, wurde zunächst die RNA in H<sub>2</sub>O bei 90 °C denaturiert und anschließend bei RT renaturiert. Nach Zugabe der restlichen Komponenten erfolgte eine 20 h Inkubation bei 16 °C. Abschließend wurde die RNA mit Amiconfiltern entsalzt und ggf. über ein Gel gereinigt.

### **Zirkularisierung mittels T4 RNA Ligase 1 (NEB)**

Die Ligation einer 5'-monophosphorylierten RNA, zum Zweck der Zirkularisierung, konnte mittels T4 RNA Ligase 1 durchgeführt werden. Dafür wurden folgende finale Mengen in einem Volumen von 100 µl eingesetzt: ~150 pmol 5'-monophosphorylierten RNA, 1x T4 RNA Ligase 1 Puffer, 20 % DMSO, 1 mM ATP, 0,4 U/µl Ribolock® RNase Inhibitor, sowie 0,5 U/µl T4 RNA Ligase 1. Zunächst wurde die RNA bei 90 °C denaturiert und anschließend bei RT renaturiert. Nach Zugabe der restlichen Komponenten erfolgte eine 20 stündige Inkubation bei 16 °C. Anschließend erfolgte eine Amiconfiltration um die RNA zu entsalzen.

### **Zirkularisierung mittels T4 RNA Ligase 2 (NEB)**

Für die Zirkularisierung einer 5'-monophosphorylierten RNA mittels T4 RNA Ligase 2 wurden 20 µl – Ansätze verwendet: ~50 pmol 5'-monophosphorylierten RNA, 1x T4 RNA Ligase 2 Puffer, 2 U/µl T4 RNA Ligase 2. Die RNA wurde bei 90 °C denaturiert und anschließend bei RT renaturiert. Nach Zugabe des Ligasepuffers und der Ligase erfolgte eine Inkubation für 2,5 h bei 37 °C. Die RNA wurde im Anschluss direkt für analytische Gele verwendet.

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Generierung von dsDNA-Templaten ausgehend von Plasmiden oder dem RC-RT-PCR-Assay, wurde das Taq PCR Kit (NEB) verwendet. Schmelztemperaturen wurden mit dem Oligoanalyzer 3.1 (IDT, <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) bestimmt. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben in einem Thermocycler im 50 µl Maßstab durchgeführt: 1x Standard Taq Puffer, 0,2 µM Primer, 10 ng/µl Plasmid, 0,2 mM dNTPs und 1,25 U/50µl Taq DNA Polymerase. Nach der Reaktion wurde die DNA mittels Amiconfiltern aufkonzentriert und entsalzt. Die finale DNA konnte direkt für *in vitro* Transkriptionen verwendet werden.

Programm:

1.	Denaturierung	98 °C	30 s	
2.	Denaturierung	98 °C	30 s	} 30 Zyklen
3.	Annealing	55 °C	30 s	
4.	Elongation	68 °C	30 s	
5.	Finale Elongation	68 °C	4 min	

### *rolling circle*-Reverse Transkriptions-Amplifikations Assay (RC-RT-PCR Assay)

Reverse Transkription (RT): Für die reverse Transkription wurde das *high-capacity cDNA reverse transcription Kit* verwendet. Die Reaktion wurde mit folgendem Ansatz in einem Thermocycler im 10 µl Maßstab durchgeführt: 1 – 5 pmol RNA, 1x RT Puffer, 2,5x dNTP Mix, 5 µM RT-DNA-Primer, 5 U/µl reverse Transkriptase.

Programm RT:

1.	Denaturierung	98 °C	30 s
2.	Renaturierung	25 °C	10 min
3.	Inkubation	37 °C	120 min
4.	Denaturierung	85 °C	5 min
5.	Ende	16 °C	4 min

## Experimenteller Teil

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Die anschließende PCR wurde nach Standardbedingungen wie bereits beschrieben mit 1 µl der RT-Reaktion durchgeführt.

Für eine Analyse mittels *real time* PCR wurde dem Reaktionsansatz 0,01x SYBR Gold zugesetzt.

Programm *real time* PCR:

1.	Denaturierung	95 °C	10 min	} 40 Zyklen
2.	Denaturierung	95 °C	15 s	
3	Annealing	50 °C	1 min	

Gegebenenfalls erfolgte eine finale Untersuchung des Assays mittels PAGE oder Agarosegelelektrophorese.

### ***Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)***

Die Click-Reaktion zur Farbstoffmarkierung von modifizierter RNA wurde in einem 20 µl – Ansatz durchgeführt. Dafür wurden folgende Mengen vereint: 1x PUS-Puffer, ~ 5 µl eines *in vitro* Transkriptionsansatzes, 5 mM THPTA, 5 mM HAsc, 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, ~ 0,5 nM Azid/Alkin-Farbstoff.

Sollte die Click-Reaktion zur Zirkularisierung genutzt werden, wurden folgende Mengen in einem 50 µl – Ansatz verwendet: 1x PUS-Puffer, ~ 100 pmol modifizierte RNA, ggf. 1 nmol DNA-Splint, 5 mM THPTA, 5 mM HAsc, 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>.

Die HAsc – Lösung wurde immer vor der Reaktion frisch hergestellt und filtriert. Der Reaktionsansatz wurde in der angegebenen Reihenfolge pipettiert und mit einem scharfen Argonstrom entgast. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 25 °C, 250 rpm und ggf. unter Lichtausschluss. Kleinere Reaktionsansätze wurden direkt für analytische Gele verwendet. Große Ansätze wurden hingegen mit Ethanolfällung und Amicon Filtration aufgearbeitet.

## **Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

### **Denaturierende PAGE**

Die denaturierende PAGE wurde sowohl zur Analyse als auch zur Aufreinigung der RNA verwendet. Die Analyse enzymatisch hergestellter RNA erfolgte mittels 0,75 mm Gelen (83 mm x 70 mm x 0,75 mm). Die Aufreinigung erfolgte hingegen mit 1,5 mm Gelen (83 mm x 70 mm x 1,5 mm). Die Gele wurden mit 20 %iger denaturierender Gellösung und 7 M Harnstoff in 0,5x TBE hergestellt. Die Gellösungen hatten ein Endvolumen von 5 ml für 0,75 mm Gele und 10 ml für 1,5 mm Gele. Nach Einstellung der gewünschten Gelkonzentration wurden 1/200 Volumen APS und 1/1000 Volumen TEMED zur Lösung gegeben, was die Polymersierungsreaktion startete. Nach vollständiger Polymerisierung erfolgte ein 30-minütiger Vorlauf, danach wurden die Proben aufgetragen. Als Marker diente denaturierender Ladepuffer mit Xylencyanol und Bromphenolblau. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet und eine Spannung von 300 V angelegt. Nach ausreichend zurückgelegter Laufstrecke des Xylencyanols und Bromphenolblaus wurde der Lauf gestoppt. Bei präparativen Gelen erfolgte zunächst die RNA-Detektion unter UV-Licht bei 254 nm, mit anschließender RNA-Elution aus dem Gel. Bei analytischen Gelen erfolgte die Bildaufnahme mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System (*BioRad*) nach SYBR-Gold-Färbung, sofern kein Fluorophor verwendet wurde.

### **Native PAGE**

Die native PAGE wurde ausschließlich zur Untersuchung von Protein-DNA-Bindungen (EMSA) verwendet. Hierfür wurden wie bei der denaturierenden PAGE sowohl 0,75 mm Gele (83 mm x 70 mm x 0,75 mm) als auch 1,5 mm Gele (83 mm x 70 mm x 1,5 mm) verwendet. Zur Herstellung der gewünschten Gelkonzentration wurde eine 20%ige native PAA-Lösung mit 0,5x TBE verdünnt. Die Gellösungen hatten ein Endvolumen von 5 ml für 0,75 mm Gele und 10 ml für 1,5 mm Gele. Die Polymerisierung wurde durch Zugabe von 1/200 Volumen APS und 1/1000 Volumen TEMED gestartet. Anschließend erfolgte ein 30-minütiger Vorlauf. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE und der Lauf wurde mit einer Spannung von 300 V durchgeführt. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System (*BioRad*) nach SYBR-Gold-Färbung der RNA, sofern kein Fluorophor verwendet wurde.

### **RNA-Elution aus PAA-Gelen mittels Diffusion**

Zur Isolation von RNA aus Polyacrylamidgelen, wurden die Banden mittels Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und zerkleinert. Anschließend wurden die Gelstücke in einem Eppendorfgefäß mit 0,3 M NaOAc pH 5,6 bedeckt und 2 h geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung gesammelt und die Gelstücke in frischer Lösung für weitere 2 h geschüttelt. Auch diese Lösung wurde gesammelt und die Gelstücke nochmals über Nacht in frischer Lösung geschüttelt. Die vereinten Elutionslösungen wurden anschließend für 24 h mit Ethanol gefällt um eine maximale Ausbeute zu gewährleisten. Abschließend wurde das Pellet in dH<sub>2</sub>O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbas Z, Afzal R (2013) Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: a review. *World J. Hepatol*, 5, 666-675.
- Alves C, Brnaco C, Cunha C (2013) Hepatitis delta virus: a peculiar virus. *Adv. Virol.* 2013, 560105.
- Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bortok O, Hanan M, Evental N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S (2014) circRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 56, 55-66.
- Bahn JH, Zhang Q, Li F, Chan TM, Lin X, Kim Y, *et al.* (2015) The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva, *Clin. Chem.*, 61, 221-230.
- Barrio JR, Barrio MC, Leonard NJ, England TE, Uhlenbeck OC (1978) Synthesis of modified nucleoside 3',5'-bisphosphates and their incorporation into oligoribonucleotides with T4 RNA ligase. *Biochemistry*, 17, 2077-2081.
- Brehm SI, Cech TR (1983) Fate of an intervening sequence ribonucleic acid: excision and cyclization of the Tetrahymena ribosomal ribonucleic acid intervening sequence *in vivo*. *Biochemistry*, 22, 2390-2397.
- Bruce AG, Uhlenbeck OC (1978) Reactions at the termini of tRNA with T4 RNA ligase. *Nucleic Acids Res.*, 5, 3665-3677.
- Capel B, Swain A, Nicolis A, Hacker A, Walter M, Koopman P, *et al.* (1993) Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell*, 73, 1019-1030.
- Cech TR (1990) Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 543-568.
- Chan TR, Hilgraf R, Sharpless KB, Fokin VV (2004) Polytriazoles as copper (I)-stabilizing ligands in catalysis. *Organic Letters*, 6, 2853-2855.
- Chen X, El-Sagheer AH, Brown T (2014) Reverse transcription through a bulky triazole linkage in RNA: implications for RNA sequencing. *ChemComm*, 50, 7597-7600.
- Chen Z, Zhang Y (2005) Dimethyl sulfoxide targets phage RNA polymerases to promote transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333, 664-670.
- Claverie JM (2001) What If There Are Only 30,000 Human Genes? *Science*, 291, 1255-1257.
- Cocquerelle C, Mascres B, Hetuin D, Bailleul B (1993) Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J.*, 7, 155-160.
- Davies BP, Dissertation (2008) A Homogenous Fluorescence Assay of micro RNA Maturation. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.

- Dojahn CM (2012) Dissertation, Synthese und Screening von Inhibitoren der mikroRNA-Reifung. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Dojahn CM, Hesse M, Arenz C (2013) A chemo-enzymatic approach to specifically click-modified RNA. *Chem Commun (Camb)*, 49, 3128-3130.
- Dropcho EJ, Chen YT, Posner JB, Old IJ (1987) Cloning of a brain protein identified by autoantibodies from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 4552-4556.
- El-Sagheer AH, Brown T (2010) New strategy for the synthesis of chemically modified RNA constructs exemplified by hairpin and hammerhead ribozymes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 107, 15329-15334.
- England TE, Uhlenbeck OC (1978) Enzymatic oligoribonucleotide synthesis with T4 RNA Ligase. *Biochemistry*, 17, 2069-2076.
- Esquela-Kerscher A, Slack YT (2006) Oncomirs-microRNAs with role in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 6, 259-269.
- Garzon R, Calin GA, Croce CM (2009) MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Med.*, 50, 167-179.
- Gao Y, Wang J, Zhao F (2015) CIRI: an efficient and unbiased algorithm for *de novo* circular RNA identification. *Genome Biol.*, 16, 4.
- Grabowski PJ, Zaug AJ, Cech TR (1981) The intervening sequence of the ribosomal RNA precursor is converted to a circular RNA in isolated nuclei of tetrahymena. *Cell*, 23, 467-476.
- Guo JU, Agarwal V, Guo H, Bartel DP (2014) Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol.*, 15, 409.
- Hansen TB, Veno MT, Damgaard CK, Kjems J (2015) Comparison of circular RNA prediction tools. *Nucleic Acids Res.*, 44, e58.
- Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, *et al.* (2011) miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J.*, 30, 4414-4422.
- Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J (2013) Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 495, 384-388.
- Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK (2013) Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Res.*, 73, 5609-5612.
- Hao Z, Yang J, Wang C, Li Y, Zhang Y, Dong X, *et al.* (2015) Micro-RNA-7 inhibits metastasis and invasion through targeting focal adhesion kinase in cervical cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 8, 480-487.
- Hentze MW, Preiss T (2013) Circular RNAs: splicing's engine variations. *EMBO J.*, 32, 923-925.

- Hesse M (2016) Dissertation, Chemo-enzymatische Werkzeuge zur Untersuchung von nicht-codierender RNA. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Humphries B, Yang C (2015) The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget*, 6, 6472-6498.
- Inoue T, Sullivan FX, Cech TR (1986) New reactions of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena and the mechanism of self-splicing. *J. Mol. Biol.*, 189, 143-165.
- Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath HAT, Orejuela MR, Piechotta M, Levanon EY, Landthaler M, Dieterich C, *et al.* (2015) Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell Rep.*, 10, 170-177.
- Jeck WR, Sharpless NE (2014) Detection and characterizing circular RNAs. *Nat. Biotechnol.*, 32, 453-461.
- Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, *et al.* (2013) Circular RNAs are abundant, conserved and associated with ALU repeats. *RNA*, 19, 141-157.
- Jiao J, Gao T, Shi H, Sheng A, Xiang Y, Shu Y, Li G (2018) A method to directly assay circRNA in real samples. *ChemComm*, 54, 13451-13454.
- Kalinowski FC, Brown RA, Ganda C, Giles KM, Epis MR, Horsham J, *et al.* (2014) microRNA-7: a tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 54, 312-317.
- Kikuchi Y, Hishinuma F, Sakaguchi K (1978) Addition of mononucleotides to oligoribonucleotides acceptors with T4 RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75, 1270-1273.
- Kim YH, Kwei KA, Girard L, Salari K, Kao J, Pacyna-Gengelbach M, Wang P, Hernandez-Boussard T, Gazdar AF, Petersen I, Minna JD, Pollack JR (2010) Genomic and functional analysis identifies CRKL as an oncogene amplified in lung cancer. *Oncogene*, 29, 1421-1430.
- Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB (2001) Click-Chemie diverse Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen. *Angewandte Chemie*, 113, 2056-2075.
- Kore AR, Charles I, Yang L, Kuersten S (2009) Synthesis and activity of modified cytidine 5'-monophosphate probes for T4 RNA ligase 1. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 28, 292-302.
- Lasda E, Parker R (2014) Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA*, 20, 1829-1842.
- Lee HL, Lim HK, Jung W, Hah SS (2012) Incorporation Efficiency of 5'-Azido-5'-Deoxyguanosine into 5'-Terminus of RNA for Preparation of Azido-Funktionalized RNA. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 33 (11), 3861-3863.
- Lee HY, Doudna JA (2012) TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA*, 18, 2012-2019.



- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.
- Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, *et al.* (2015) Exon-Intron circular RNAs regulate transcriptions in the nucleus. *Nat. Struct. Biol.*, 22, 256-264.
- Li F, Zhang L, Li W, Deng J, Zheng J, An M, *et al.* (2015) Circular RNA ITCH has inhibitory effect o ESCC by suppressing the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Oncotarget*, 6, 6001-6013.
- Li-Pook-Than J, Bonen I (2016) Multiple physical forms of excised group II intron RNAs in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, 34, 2782-2790.
- Liang D, Wilusz JE (2014) Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes Dev.*, 28,2233-2247.
- Lignini I, Timoteo GD, Rossi F, ... Laneve P, Rajewsky N, Bozzoni I (2017) Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that can be Translated and Functions in Myogenesis. *Molecular Cell*, 66, 22-37.
- Lukiw WJ (2013) Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD). *Front. Genet.*, 4, 307.
- Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N (2013), Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 495, 333-338.
- Meza-Sosa KF, Pérez-García EI, Camacho-Concha N, López-Gutiérrez O, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez I (2014) MiR-7 promotes epithelial cell transformation by targeting the tumor suppressor KLF4. *PLoS One*, 9, e102987.
- Milligan JF, Uhlenbeck OC (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods in enzymology*, 180, 51-62.
- Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, Uhlenbeck OC (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T/ RNA polymerase and synthetic DNA Templates. *Nucleic Acids Research*, 15, 8783-8798.
- Molina-Sanchez MD, Martinez-Abarca F, Toro N (2006) Excision of the *Sinorhizobium meliloti* group II intron RmInt1 as circles *in vivo*. *J. Biol. Chem*, 281, 28737-28744.
- Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, Kern SE, Ruppert M, Oliner JD, Kinzler KW, Vogelstein B (1991) Scrambled exons. *Cell*, 64, 607-613.
- Peredes E, Das SR (2011) Click chemistry for rapid labeling and ligation of RNA. *ChemBioChem*, 12, 125-131.
- Paredes E, Evans M, Das SR (2011) RNA labeling, conjugation and ligation. *Methods*, 54, 251-259.

- Petkovic S, Müller S (2015) RNA circularization strategies *in vivo* and *in vitro*. *Nucl. Acid. Res.*, 43, 2454-2465.
- Pfander S, Fiammengo R, Kirin SI, Metzler-Nolte N, Jäschke A (2007) Reversible side-specific tagging of enzymatically synthesised RNAs using aldehyde-hydrazine chemistry and protease-cleavage linkers. *Nucleic Acids Res.*, 35, e25.
- Pitsch S, Weiss PA, Wu X, Ackermann D, Honegger T (1999) Fast and Reliable Automated Synthesis of RNA and Partially 2'-O-Protected Precursors ('Caged RNA') Based on Two Novel, Orthogonal 2'-O-Protecting Groups, Preliminary Communication. *Wiley Online Library*, 6, 1753-1761.
- Pitulle C, Kleinedam RG, Sproat B, Krupp G (1992) Initiator oligonucleotides for the combination of chemical and enzymatic RNA synthesis. *Gene*, 112, 101-105.
- Qu S, Yang X, Li X, Wang J, Gao Y, Shang R, Sun W, Dou K, Li H (2015) Circular RNA: A new star of noncoding RNAs. *Cancer Lett.*, 365, 141-148.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates development timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901-906.
- Romaniuk PJ, Uhlenbeck OC (1983) Joining of RNA molecules with RNA ligase. *Methods Enzymol.*, 100, 52-59.
- Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB (2002) stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective „ligation“ of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 41, 2596-2599.
- Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang OL, Brown PO (2013) Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet*, 9, e1003777.
- Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO (2012) Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One*, 7, e30733.
- Samanta A, Krause A, Jäschke A (2013) A modified dinucleotide for side-specific RNA-labelling by transcription priming and click chemistry. *Chem. Commun.*, 50, 131-1316.
- Saroh J, Yamamura T (2004) Gene expression profile following stable expression of the circular prion protein. *Cell Mol. Neurobiol.*, 24, 793-814.
- Schlatterer JC, Jäschke A (2006) Universal initiator nucleotides for the enzymatic synthesis of 5'-amino- and 5'-thiol-modified RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 344, 887-892.
- Schoch J, Ameta S, Jäschke A (2011) Inverse electron-demand Diels-Alder reactions for the selective and efficient labeling of RNA. *Chem. Commun. (Camb.)*, 47, 12536-12537.
- Shagin DA, Rebrikov DV, Kozhemyako VB, Altshuler IM, Shcheglov AS, Zhulidov PA *et al.* (2002) A novel method for SNP detection using a new suplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res.*, 12, 1935-1942.

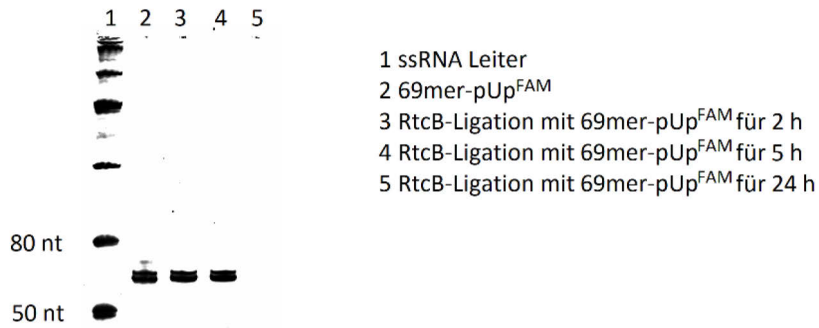
- Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y, Song Y (2013) Long non-coding RNAs: a frontier in the study of human diseases. *Cancer Lett.*, 339, 159-166.
- Stark MR, Pleiss JA, Deras M, Scaringe A, Rader SD (2006) An RNA ligase-mediated method for the efficient creation of large, synthetic RNAs. *RNA*, 12, 2014-2019.
- Starke S, Jost I, Rosbach O, Schneider T, Schreiner T, Schreiner S, Hung I, Bindereif A (2015) Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Rep.*, 10, 103-111.
- Stern MK, Bashkin JK, Sall ED (1990) Hydrolysis of RNA by transition metal complexes. *Journal of the American Chemical Society*. 112, 5357-5359.
- Suto T, Yokobori T, Yajima R, Morita H, Fujii T, Yamaguchi S, *et al.* (2015) Micro-RNA-7 expression in colorectal cancer es associated with poor prognosis and regulates ceruxnimab sensitivity via EGFR regulation. *Carcinogenesis*, 36, 338-345.
- Suzuki H, Tsukahara T (2014) A view of pre-mRNA splicing from Rnase R resistant RNAs. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 9331-9342.
- Szabo L, Salzman J (2016) Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges. *Nature Rev.*, 17, 679-692.
- Szabo L, *et al.* (2015) Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. *Genome Biol.*, 16, 126.
- Tanaka N, Shuman S (2011) RtcB is the RNA Ligase Component of *Escherichia coli* RNA repair operon. *Journal of Biological Chemistry*, 286, No. 10, 7727-7731.
- Taulli R, Loretelli C, Pandolfi PP (2013) From pseudo-ceRNAs to circ-ceRNAs: a tale of cross-talk and competition. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20, 541-543.
- Wahl F, Jäschke A (2012) PEG-tethered guanosine acetal conjugates for the enzymatic synthesis of modified RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417, 1224-1226.
- Wang Y, Wang Z (2014) Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *RNA*, 21, 172-179.
- Westholm JO, *et al.* (2014) Genom-wide analysis of *Drosophila* circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation. *Cell Rep.*, 9, 1966-1980.
- Winz ML, Samanta A, Benzinger D, Jäschke A (2012) Side-specific terminal and internal labeling of RNA by poly(A) polymerase tailing and copper-catalyzed or copper-free strain-promoted click chemistry. *Nucleic Acids Research*. 40, No. 10, e78
- Zaphiropoulos PG (1996) Circular RNAs from transcripts of the rat cytochrome P450 2C24 gene: correlation with exon skipping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 6536-6541.

Zaphiropoulos PG (1997) Exon skipping and circular RNA formation in transcripts of the human cytochrome P-450 2C18 gene in epidermis and of the rat androgen binding protein gene in testis. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 2985-2993.

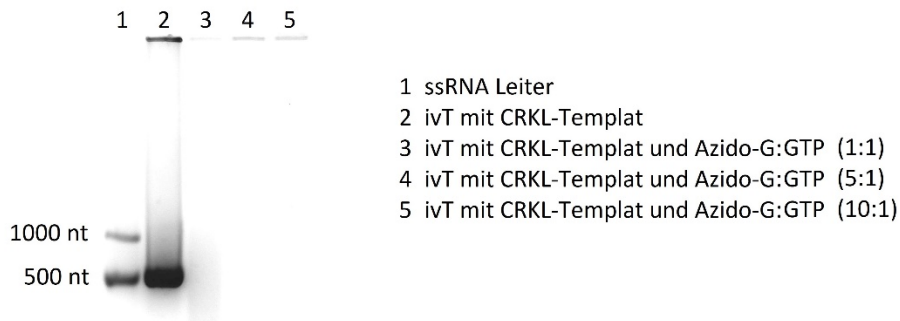
Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH *et al.* (2013) Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol. Cell*, 51, 792-806

Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L (2014) Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 159, 134-147.

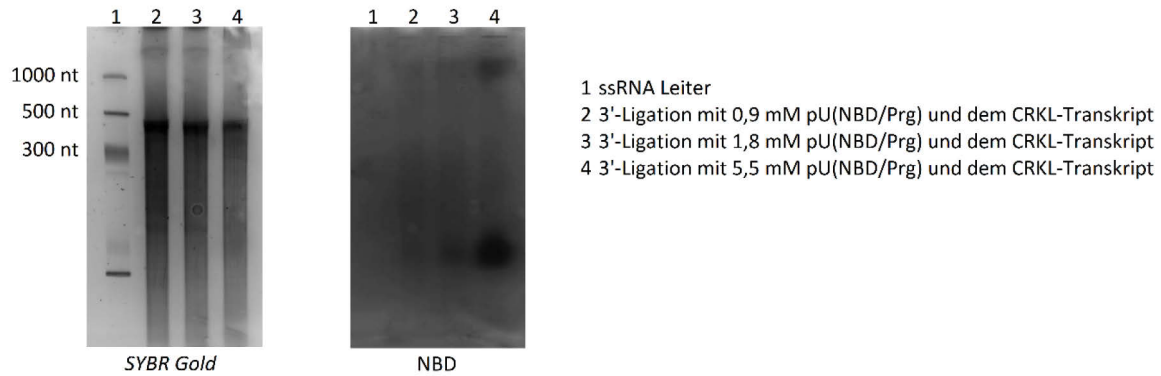
## 8. Anhang



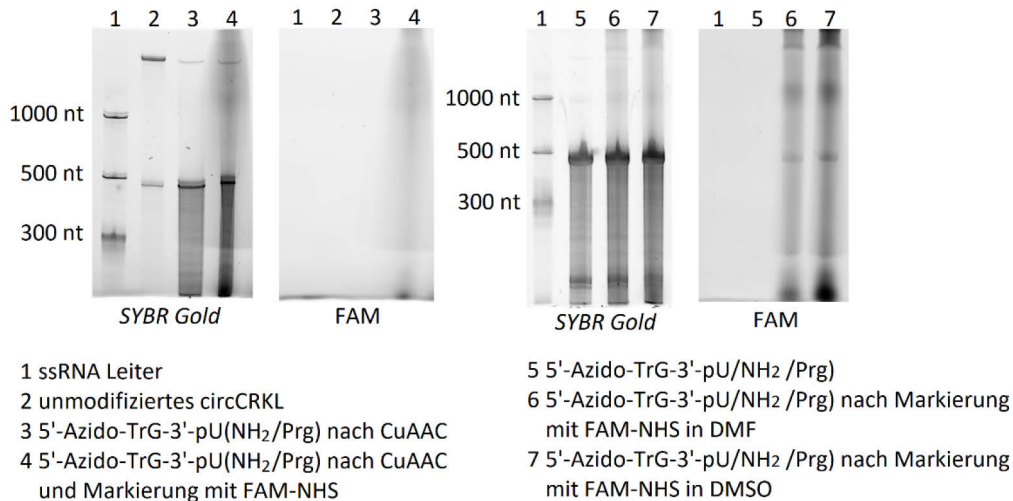
**Abb. 8-1 | Zyklisierungversuche mit dem modifizierten 3'-pUpPrg-69mer über Ligation mit der RtcB-Ligase.** Es wurden Proben nach 2, 5 und 24 h genommen um den Reaktionsverlauf zu überwachen (Spur 3-5) und mit dem linearen 3'-pUpPrg-69mer (Spur 2) verglichen. Die Detektion erfolgte nach *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{ex/em} = 470/535$  nm.



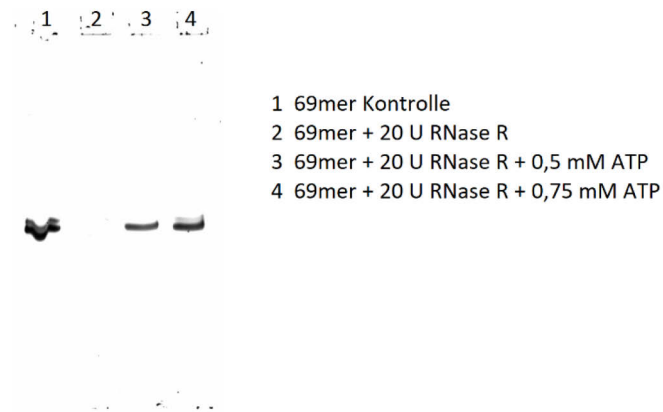
**Abb. 8-2 | 2 %iges Agarosegel zur Analyse der *in vitro* Transkription mit Azido-G und dem CRKL-Template nach der *run-off* Methode.** Die *in vitro* Transkription wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Azido-G bei gleich bleibender Menger der NTPs durchgeführt. Ausschließlich die Probe ohne Azido-G (Spur 2) zeigt das gebildete CRKL-Transkript. Die Detektion erfolgte nach *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{ex/em} = 470/535$  nm.



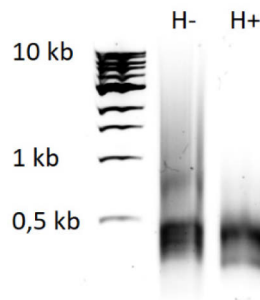
**Abb. 8-3 | Ligation von pU(NBD/Prg) an den 3'-Terminus des CRKL-Transkripts.** 5 %iges Gel zur Analyse der Ligation mit verschiedenen Konzentrationen von pU(NBD/Prg) (Spur 2-4). Die Detektion erfolgte vor und nach *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm.



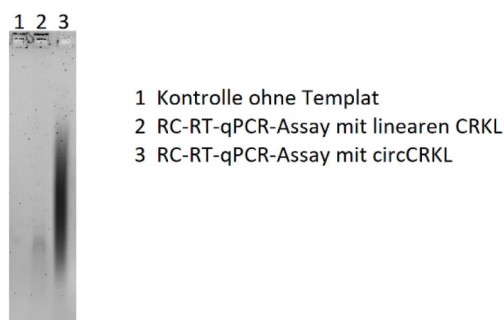
**Abb. 8-4 | Markierung des 5'-Azido-TrG-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg)-CRKL mit FAM-NHS.** 5 %iges denaturierendes Gel wurde zur Analyse der FAM-NHS-Reaktion in DMSO nach erfolgter Zyklisierung des 5'-Azido-TrG-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg)-CRKL über CuAAC (Spur 4) im Vergleich mit der nicht markierten Zyklisierungsreaktion (Spur 3) und dem unmodifizierten circCRKL (Spur 2). Zusätzlich erfolgten Markierungsversuche mit dem nicht zyklisierten 5'-Azido-TrG-3'-pU(NH<sub>2</sub>/Prg)-CRKL und FAM-NHS in DMF (Spur 6) und DMSO (Spur 7). Sowohl die Detektion der *SYBR Gold*-Färbung, als auch zuvor des FAM-Signals, erfolgte bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm.



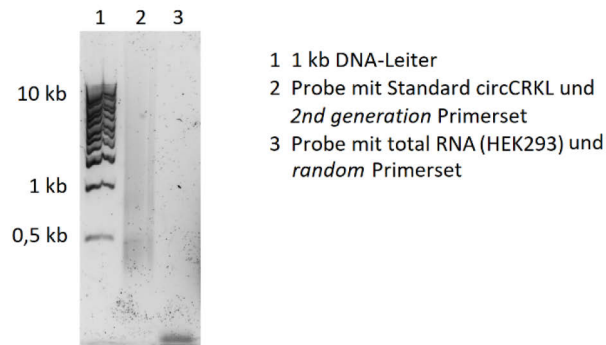
**Abb. 8-5 | Aktivitätstest der RNase R bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen.** Der Verdau des 69 nt großen Testtranskripts durch RNase R zeigt eine Abhängigkeit von ATP-Verunreinigungen. Die Detektion erfolgte vor und nach *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535 \text{ nm}$ .



**Abb. 8-6 | 1 %iges Agarosegel zur Analyse des RC-RT-PCR-Assays mit zirkulärem CRKL und RNase H.** Die verwendeten 0,1 pmol circCRKL wurden vor Durchführung des Assays mit (H+) und ohne (H-) RNase H in Beisein von 5  $\mu\text{M}$  RT-DNA-Primer behandelt. Nach *SYBR Gold*-Färbung erfolgte die Detektion bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535 \text{ nm}$ .



**Abb. 8-7 | 1 %iges Agarosegel zur Analyse des RC-RT-qPCR-Assays.** Die qPCR wurde mit 17 fmol transkribiertes lineares oder zirkuläres CRKL durchgeführt und über *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535 \text{ nm}$  detektiert.



**Abb. 8-8 | 1 %iges Agarosegel zur Bestätigung der spezifischen Primerbindung an CRKL in biologischen Gesamt-RNAs.** Durchführung des RC-RT-PCR-Assays der zweiten Generation mit einem *random* Primerset und Gesamt-RNA aus HEK293. Der Assay wurde ebenfalls mit der circCRKL-Standardprobe und dem *2nd generation* Primerset als Positivkontrolle zum Vergleich durchgeführt. Die Bildgebung erfolgte abschließend mit *SYBR Gold*-Färbung bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/535$  nm.



# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Christoph Arenz für die interessante und vielseitige Themenstellung, die fortwährende Unterstützung und die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken. Zusätzlich möchte ich mich für die Anfertigung des Gutachtens bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Professoren Frau Prof. Dr. Dorothea Fiedler und Frau Prof. Dr. Sabine Müller für die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Nikolaus Rajewsky für die Bereitstellung der PVT1- und CRKL-Plasmide und Christian Kimmich für die Synthese der zahlreichen Nukleosidbausteine danken. Des Weiteren bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Seitz für die Bereitstellung ihres Laborequipments.

Ich bedanke mich natürlich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Arbeitsatmosphäre und die vielen Ratschläge in schweren Stunden. Besonders möchte ich hier Stephanie Diederich, Natalia Loibl, Jacqueline Schneider und Danny Jeske für die vielen biologischen Tipps erwähnen. Essa M. Saide danke ich für die guten fachlichen Gespräche in seinem Labor. Zusätzlich danke ich Christian Kimmich, Kevin Prause und Fernando de Leon für die vielen interessanten Gespräche in der Mittagspause. Ebenfalls danke ich Sabine Herrmann für die administrative Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Ich möchte meinen Freunden Franziska Jennert und Tom Lühr für das Aufmerksame Lektorat meiner Arbeit in sportlich kurzer Zeit danken.

Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern, sowie meinem Bruder und meiner Schwägerin, die mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Ehefrau Sarah für ihre stetige Unterstützung. Ich bin froh dich in meinem Leben zu haben und freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft.



# Publikationen & Konferenzteilnahmen

## Publikationen

Das zweite Thema dieser Arbeit wurde bereits vollständig veröffentlicht:

Boss M, Arenz C (2019) A Fast and Easy Method for Specific Detection of circRNA by Rolling Circle Amplifikation. *ChemBioChem*, 20, early online.

## Konferenzteilnahmen

**2015** VII. Nukleinsäurechemie-Treffen, Berlin, Deutschland

**2016** Einstein-Meeting, Berlin, Deutschland

## **Erklärung zur Veröffentlichung in der Hochschul-schriftenstelle gemäß § 15 Abs. 5**

Ich erkläre, dass die von mir in der Universitätsbibliothek abgegebene schriftliche und/oder elektronische Version der Dissertationsschrift mit der angenommenen Dissertation übereinstimmt.

Ich habe nur die Mängel beseitigt und die Auflagen erfüllt, die mir bei der Verteidigung mitgeteilt und deren Erfüllung der Vorsitzende der Promotionskommission bestätigt hat.

Ravensburg, d. 16.06.2020

---

Ort, Datum

Unterschrift

# Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 42/2018 am 11.07.2018, angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ravensburg, d. 11.02.2020

---

Ort, Datum

Unterschrift

## Summary

Circular RNAs belong to the group of long, non-coding RNAs and have gene regulating functions, comparable to miRNA. However, the field of circRNA research is proceeding slowly due to the lack of efficient analytical methods. That's the reason why the development of new analytical methods plays a keyrole within characterisation and identification of circRNAs.

This thesis comprises two projects dealing on one hand with the creation of a protocol for the generation of functional circRNA on and the other hand, an assay to differentiate circular and linear RNA.

For the generation of circRNA a non-modified circRNA was produced as positiv control by using T4 RNA ligase 2. After the addition of a modification step with T4 RNA ligase 1, it was possible to generate circRNA with alkyne functionalization. Due to limited yields of modified circRNA, the protocol was adapted and a protocol for chemical ligation was established. In this new procedure a RNA with 5'-azido modification was generated by *in vitro* transcription, followed by incorporation of a 3'-alkyne modified building block with additional amine funktionality at the RNA-3'-end. Consecutively, it was possible to perform a cyclization with the double modified RNA by CuAAC.

The second project comprises the establishment of an assay in order to differentiate circular and linear RNA. A rolling circle mechanism was utilized by reverse transcription of a circular RNA transcript, resulting in a multimeric cDNA. Following DNA amplification by qPCR, a specific fragmentation pattern for circRNA was verified by gel electrophoresis. In contrast to this, for linear RNA, a monomeric DNA pattern was seen. Subsequently the assay was advanced to a detection method for circular RNA in biological samples. A final gel electrophoresis allows the identification of false-positive results. In the future, the here developed method can be applied for fast and easy detection of circRNAs in biological samples.